

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА КЛІНІЧНОЇ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

КЛІНІЧНА БІОХІМІЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН

Навчально-методичний посібник

*для самостійної підготовки
до практичних занять і ліцензійного іспиту «Крок-Б»*

Запоріжжя

2021

УДК 616-008.9(075.8)

К49

*Затверджено на засіданні Центральної методичної Ради ЗДМУ
та рекомендовано для використання в освітньому процесі
(протокол № від 2021 р.)*

Колектив авторів:

*С. В. Павлов – д-р біол. наук, доцент;
С. В. Горбачова – д-р. біол. наук, доцент;
С. А. Біленький – канд. мед. наук, доцент;
Н. В. Бухтіярова – канд. мед. наук, доцент;
Л. В. Баранова – канд. фарм. наук, ст.викл;
К. В. Левченко – канд. мед. наук, асистент;
Ю. В. Нікітченко – асистент;
К. А. Бурлака – асистент;
Д.В. Робота – асистент;
О.О. Марічева – асистент;*

Рецензенти:

*Б. С. Бурлака - канд. фарм. наук, доцент кафедри технології ліків;
І. С. Качан - канд. мед. наук, доцент кафедри сімейної медицини, терапії,
кардіології та неврології;*

*За загальною редакцією зав. кафедрою клінічної лабораторної діагностики
доцента, д-ра біол. наук Павлова С.В.*

Клінічна біохімія обміну речовин : навчально-методичний посібник для самостійної підготовки до практичних занять і ліцензійного іспиту «Крок-Б» // С. В. Павлов, С. В. Горбачова, С. А. Біленький [та ін.] ; за заг. ред. С. В.Павлова. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2021. – 135 с.

УДК 616-008.9(075.8)

Запропонований посібник є необхідним навчальним посібником для вивчення клінічної біохімії студентами четвертого курсу медичних факультетів спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування».

Посібник містить тематичний план лекцій та практичних занять з клінічної біохімії (модуль 1). Для кожного заняття вказана актуальність теми, що вивчається, мета заняття, перелік теоретичних питань для підготовки. Обов'язковими елементами викладення змісту виконання лабораторних робіт є детальне роз'яснення принципів методу та безпосередньо методики виконання роботи, клініко-діагностичне значення методу в практичній медицині.

Зміст і об'єм посібнику відповідають кількості аудиторних годин, які відведені на вивчення модулю 2 (3 кредити/90 годин), змісту відповідних розділів робочої програми з клінічної біохімії для студентів спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування» в умовах кредитно-модульної системи навчання.

В посібнику міститься вся необхідна інформація щодо індивідуальної самостійної роботи студентів, а також питання для підготовки до складання змістових модулів та підсумкового модульного контролю з модулю 1.

Все вище зазначене допоможе студентам при підготовці до практичних занять, модульного контролю та здачі ліцензійного іспиту «КРОК-Б».

Зміст:

1. Тематичний план лекцій	4
2. Заняття № 1	7
3. Заняття № 2	16
4. Заняття № 3	26
5. Заняття № 4	34
6. Заняття № 5	41
7. Заняття № 6	55
8. Заняття № 7	69
9. Заняття № 8	73
10. Заняття № 9	80
11. Заняття № 10	90
12. Заняття № 11	97
13. Заняття № 12	108
14. Заняття № 13	114
15. Заняття № 14	117
16. Заняття № 15	121
17. Заняття № 16	124
18. Заняття № 17	128
19. Підсумковий контроль засвоєння модулю 2	133
20. Рекомендована література	134

ТЕМАТИЧНИЙ ПЛАН ЛЕКЦІЙ

№ п/п	Тема	Кількість годин
Модуль 1. Клінічна біохімія обміну вуглеводів, ліпідів і білків в нормі та при патології. Клінічна біохімія гормонів		
1	Метаболізм моно- та дисахаридів. Лабораторна діагностика обміну глюкози	2
2	Метаболізм гомо- та гетерополісахаридів, глікопротеїнів, протеогліканів. Лабораторна діагностика його порушень	2
3	Метаболізм насичених і ненасичених вищих жирних кислот. Метаболізм кетонових тіл. Кетонемія (кетонурія).	2
4	Характеристика основних фракцій ліпопротеїнів плазми. Класифікація дисліпідемій та їх лабораторна діагностика	2
5	Загальний білок крові та його фракції. Гіпер-, гіпо-, пара- та диспротеїнемії. Характеристика протеїнограм	2
6	Функціональна характеристика найбільш важливих білків плазми	2
7	Залишковий азот крові та його фракції. Азотемії. Основні органічні безазотисті компоненти плазми	2
8	Механізми нейтралізації аммоніаку. Цикл сечовиноутворення та його порушення. Гіперамоніємії	2
9	Характеристика найбільш важливих аміноацидопатій та їх лабораторна діагностика	2
10	Медична ензимологія. Роль ферментів в діагностиці	2
11	Гормони і гормоноїди: загальна характеристика, класифікація, властивості, біологічна роль	2
12	Механізм дії білково-пептидних гормонів та біогенних амінів. Основні внутрішньоклітинні месенджери	2
13	Особливості механізму дії ліпофільних (стероїдних та тиреоїдних) гормонів.	2
14	Метаболізм, біологічна роль і механізм дії ейкозаноїдів та інших тканинних гормонів	2
15	Біохімічні функції печінки. Лабораторна діагностика їх порушень	2
16	Біохімічні механізми знешкодження ксенобіотиків. Роль мікросомального окислення та коньюгації.	2
17	Кислотно-лужний стан. Механізми забезпечення нормальних значень рН	2
18	Водно-електролітний обмін та його порушення. Гормональна регуляція водно-сольового обміну, роль нирок	2
Всього		36

ЗАНЯТТЯ № 1

1. ТЕМА: Обмін глюкози. Діагностика гіпо-, гіперглікемій, глюкозурії.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ:

На вміст глюкози в крові впливають різноманітні фізіологічні та патологічні процеси, знання яких надзвичайно необхідне у професійній діяльності лаборанта.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

На основі знань про будову та метаболізм вуглеводів сформуванню уявлення про патобіохімію вуглеводного обміну, методи визначення глюкози та їх клініко-діагностичне значення.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Вуглеводи – невід'ємна складова частина клітин і тканин всіх живих організмів, один із чотирьох найбільших класів біомолекул (разом з білками, ліпідами та нуклеїновими кислотами). Вони містяться переважно в рослинних продуктах. Вуглеводи ще часто називають **цукрами**. На їх частку припадає 60-70% харчового раціону людини. Середня потреба у вуглеводах – 400-500 г/добу, в т.ч.: крохмалю 350-400 г, моно- та дисахаридів 50-100 г, харчових баластних речовин (целюлоза та пектинові речовини) – 25 г.

Недостатнє вживання вуглеводів призводить, насамперед, до зменшення енергозабезпечення організму. Надмірне вживання цукру сприяє карієсу зубів, порушує нормальне співвідношення між збуджувальними та гальмівними процесами в ЦНС дітей, що виявляється в неврівноваженій поведінці. Надлишок цукру підтримує запальні процеси, сприяє алергізації, спотворює нормальні реакції на холод (замість розширення судин та нагрівання шкіри, відбувається їх звуження та переохолодження з усіма наслідками).

Вуглеводи – це органічні сполуки, які за хімічною природою є **полігідроксиальдегідами** або **полігідроксикетонами** (моносахариди) або перетворюються на них при гідролізі (оліго- та полісахариди). Більшості вуглеводів відповідає формула – $C_n(H_2O)_m$, звідки й походить їхня назва. Але відкриття цілого ряду вуглеводів (дезоксирибоза – $C_5H_{10}O_4$, рамноза – $C_6H_{12}O_5$), в яких не дотримується дане співвідношення, назва втратила своє обґрунтування. Окрім того, деякі похідні вуглеводів містять нітроген, сульфур, фосфор і т.д.

Класифікація вуглеводів

(відповідно до особливостей їх будови і властивостей, зокрема, за здатністю гідролізуватися з утворенням різного числа мономерів):

1. Моносахариди (монози, прості цукри). До них відносяться вуглеводи, які не гідролізуються з утворенням простіших цукрів.

2. Олігосахариди (цукроподібні полісахариди) – сполуки, що гідролізуються з утворенням невеликої кількості (2-10) простих цукрів.

3. Полісахариди (нецукроподібні полісахариди) – сполуки, що гідролізуються з утворенням великої кількості цукрів-мономерів.

Коротка характеристика особливостей структури трьох вказаних груп вуглеводів приведена на схемі на наступній сторінці.

Вуглеводи в організмі людини виконують наступні головні функції:

- **енергетичну** – при їх окисненні вивільняється енергія, яка задовольняє приблизно 60% потреби в ній людини

- **інтегративну** – з вуглеводів в організмі можуть синтезуватися сполуки інших класів, зокрема ліпіди і деякі амінокислоти

- *пластичну* – вуглеводи входять до складу структурно-функціональних компонентів клітин
- *гідроосмотичну* – гіалуронова кислота зв'язує міжклітинну воду і катіони, регулюючи міжклітинний осмотичний тиск



- *кофакторну* – входять до складу кофакторів ферментів (НАД, ФАД)
- *опорну* – хондроїтин-сульфати в кістковій тканині, дерматан- та кератин-сульфати
- *захисну* (імуноглобуліни)
- *регуляторну* (гормони-глікопротеїни) та ін.

Після перетравлення та всмоктування в ШКТ вуглеводи у вигляді моносахаридів через ворітну вену поступають в печінку. Основний продукт травлення вуглеводів – **глюкоза**. Інші моносахариди можуть перетворюватися на глюкозу або продукти її метаболізму. Частина глюкози депонується в печінці у вигляді глікогену, а інша з током крові по-ступає в різні тканини та органи й використовується там. При нормальному раціоні кон-центрація глюкози в крові підтримується на рівні 3,3-5,5 ммоль/л, а в період травлення може зростати до 8 ммоль/л та вище.

В подальших перетвореннях в клітинах глюкоза та інші моносахариди беруть участь лише у вигляді фосфорних ефірів. Фосфорилювання – це обов'язкова реакція на шляхах їх подальшого використання. Вона призводить до утворення більш реакційно спроможних сполук, тому її розглядають як реакцію активації:



Дану реакцію в клітинах більшості тканин каталізує фермент гексокіназа, і лише в печінці та підшлунковій залозі – глюकोкіназа. Відмінності у властивостях цих ферментів вказані в таблиці.

За допомогою глюкокінази печінка затримує більшу частину глюкози, не допускаючи значного зростання рівня глюкози в крові. Гормон підшлункової залози інсулін підвищує активність та індукує синтез глюкокінази.

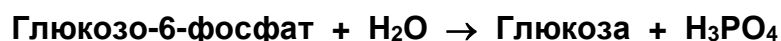
Утворення глюкозо-6-фосфату в клітинах – процес практично незворотний, тому що він супроводжується витрачанням значної кількості енергії. Це своєрідний спосіб «приватизації» глюкози клітинами, оскільки їх мембрана непроникна для глюкозо-6-фосфату. Окрім того, фосфорилювання зменшує концентрацію вільної глюкози в цитоплазмі, створюючи сприятливі умови для подальшої полегшеної її дифузії з крові в клітини.

Завдяки наявності в печінці, нирках і (частково) ентероцитах ферменту глюкозо-6-

Властивості гексокінази і глюкокінази

Ознаки	Гексокіназа	Глюкокіназа
розподіл в організмі	більшість тканин	тільки печінка
субстратна специфічність	D-глюкоза та інші D-гексози (фруктоза, маноза)	тільки D-глюкоза
константа Міхаеліса (K_m) для глюкози	низька (близько 10^{-5} моль/л)	висока (10^{-2} моль/л)
максимальна швидкість реакції	низька	висока
ретрогальмування продуктом реакції (глюкозо-6-фосфатом)	так	ні

фосфатаза, який каталізує гідролітичне відщеплення фосфатної групи, в них може відбуватися зворотнє перетворення глюкозо-6-фосфату на вільну глюкозу, яка дифундує в кров:



В деяких тканинах цей фермент практично відсутній, тому дефосфорилювання не відбувається. Приклад абсолютно незворотного проникнення глюкози в клітини – м'язи, в яких весь утворений глюкозо-6-фосфат використовується лише у власному метаболізмі.

Основне фізіологічне значення катаболізму глюкози – використання енергії, яка вивільняється, для синтезу АТФ. Деякі тканини дуже залежать від глюкози як джерела енергії. Так, клітини головного мозку впродовж доби використовують до 100 г глюкози, окислюючи її аеробним шляхом. За умов нормального клітинного дихання аеробне окиснення є переважаючим для більшості тканин і найефективнішим з точки зору енергетичної цінності. Проте в цілому ряді випадків велике значення має й анаеробний розпад глюкози, на-самперед – в м'язах в перші хвилини м'язової роботи, в еритроцитах (в яких відсутні мітохондрії), а також в різних органах за умов їх обмеженого постачання киснем (в тому числі, й у клітинах злоякісних пухлин!).

Катаболізм глюкози досить тісно зв'язаний з її анаболізмом, оскільки проміжні продукти катаболізму можуть використовуватися для синтезу інших сполук. Так фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат беруть участь в утворенні рибозо-5-фосфату – структурного компоненту нуклеотидів, а 2-фосфогліцерат може включатися в синтез певних амінокислот (серин, гліцин, цистеїн). Утворений при окисному декарбоксилюванні пірувату в печінці ацетил-КоА використовується як субстрат при біосинтезі жирних кислот та холестерину, а діоксіацетонфосфат – для синтезу гліцерол-3-фосфату та ТАГ.

Головні напрями метаболізму глюкози представлені на схемі нижче.

Метаболізм глюкози на рівні клітин багато в чому залежить від особливостей гормонального статусу організму. З факторів ендокринної регуляції концентрації глюкози в крові основна роль відводиться інсуліну – гормону, що синтезується в β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Інсулін сприяє проникненню глюкози в клітини. Це єдиний гормон, що призводить до зниження рівня глюкози.

Глюкагон – гормон, який виробляється α -клітинами острівців Лангерганса. Він активує фосфорилазу печінки що прискорює розщеплення глікогену в ній. В результаті рівень глюкози підвищується.

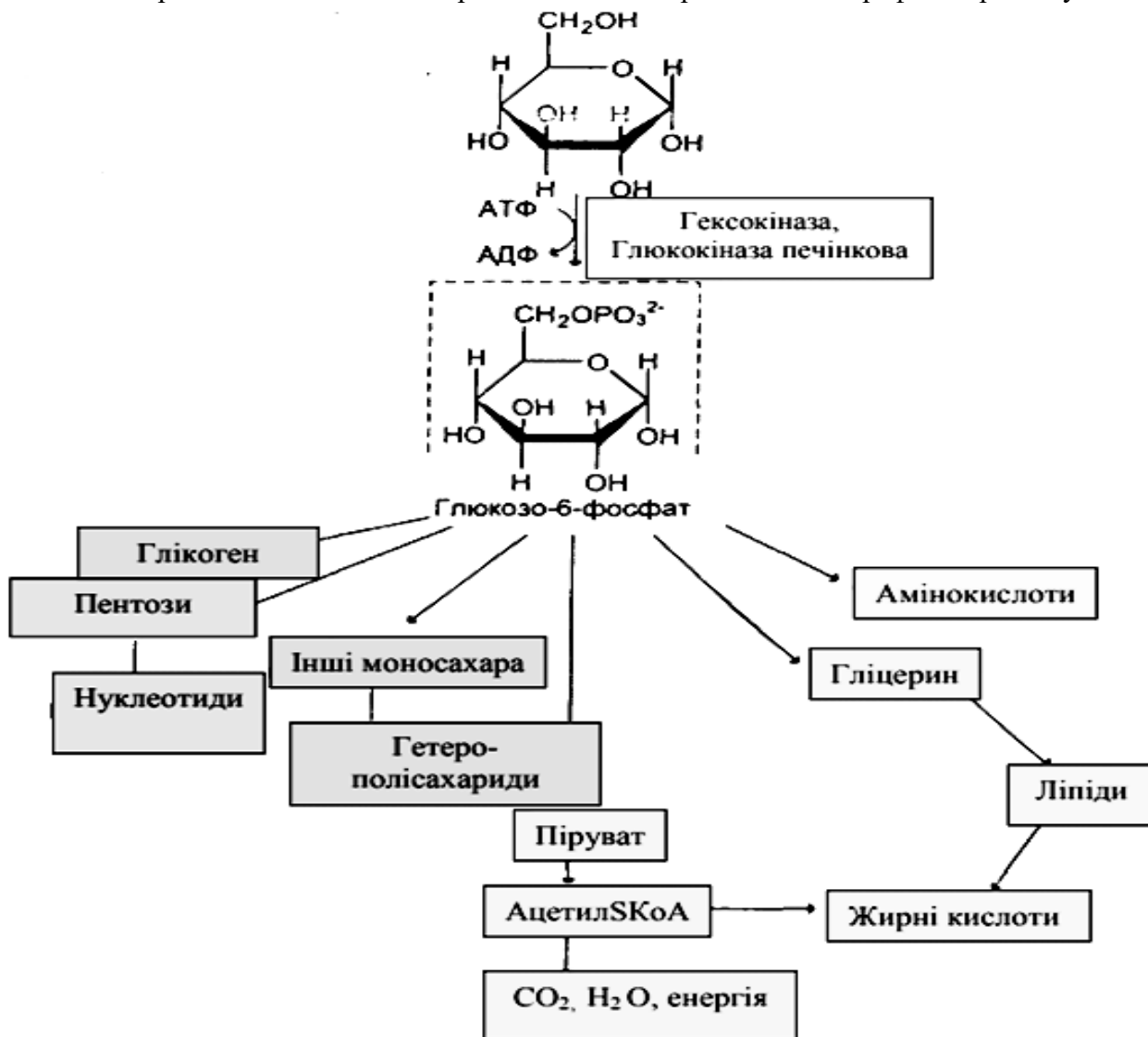
До такого ж ефекту призводять й інші контрінсулярні гормони:

1. глюкокортикоїди (*кортизол, кортизон, кортикостерон*) – гормони кори наднирників (пригнічують її окислення й сприяють утворенню глюкози шляхом глюконеогенезу)

2. тиреоїдні гормони (*тироксин, трийодтиронін*), які посилюють всмоктування глюкози і активують глікогеноліз;

3. гормони передньої долі гіпофізу (*СТГ, ТТГ, АКТГ*).

У здорових людей зниження рівня глюкози в крові викликає рефлекторно обумов-



лену інтенсифікацію глікогенолізу в печінці, а підвищення – посилює глікогенез.

Визначення концентрації глюкози в крові

Визначення концентрації глюкози в крові – одне з біохімічних досліджень, яке практично щоденно виконується в клініко-діагностичних лабораторіях. Причина виняткової популярності тесту пов'язана з високою захворюваністю на цукровий діабет. Даний тест призначається лікарями як в умовах стаціонару, так і в поліклініках. Крім того, хворі на цукровий діабет також змушені постійно контролювати рівень глюкози в крові в домашніх умовах, оскільки без цієї інформації їм важко скоригувати свою дієту, фізичні навантаження, застосування інсуліну та інших цукрознижувальних препаратів. Виняткова діагностична важливість тесту і велика частота та обсяги досліджень зумовили появу

чисельних методів визначення концентрації глюкози в крові та створення різноманітних типів приладів для їх реалізації.

В даний час існує більше сотні методів визначення глюкози, які за специфікою та хімічними механізмами можна розділити на три групи:

1. Редуктометричні (в наш час майже не використовуються через недостатню точність), які базуються на відновлювальних властивостях альдегідної групи глюкози

2. Колориметричні (в наш час майже не використовуються через недостатню точність), які базуються на властивості глюкози та деяких її похідних утворювати забарвлені сполуки

3. Ферментативні:

а) глюкозооксидазний

- фотометричний по кінцевій точці
- фотометричний кінетичний
- фотометрія відображення (відбиття) – «суха» хімія
- електрохімічний

б) гексокіназний.

Глюкозооксидазний метод

Сьогодні найбільшого поширення набули методи, засновані на використанні ферменту глюкозооксидази. В основі методу лежить наступна реакція:

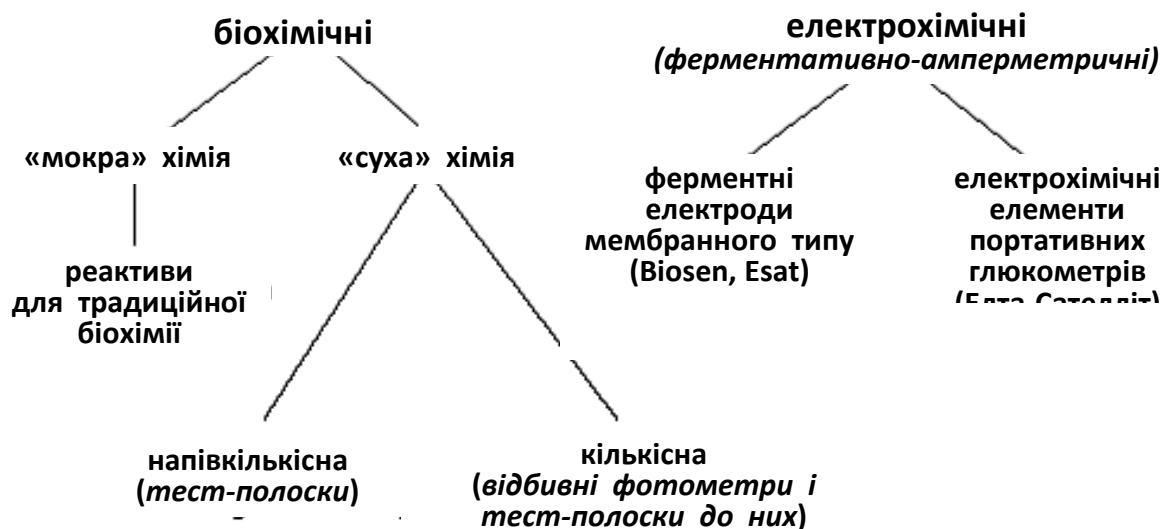
Глюкозооксидаза



Глюкозооксидаза окислює глюкозу до глюконової кислоти, каталізуючи «перенесення» двох протонів та двох електронів з першого вуглецевого (альдегідного) атому глюкози на розчинений в рідкому реагенті кисень з утворенням перекису водню. Причому, в ході реакції перекис водню відносно глюкози утворюється в еквімолярних кількостях, тобто кількість утвореного перекису (в молях) дорівнює кількості глюкози (в молях) в розчині. Таким чином, використання глюкозооксидазної реакції, трансформує досить складне завдання визначення безпосередньо концентрації глюкози в завдання визначення концентрації перекису водню, яке значно простіше першого. Насьогодні існує декілька методів визначення концентрації перекису водню, що широко застосовуються в лабораторній практиці.

Головні методи виконання глюкозооксидазної реакції, які застосовуються в сучасних лабораторіях, та способи реєстрації її результатів приведені на схемі.

Способи реєстрації результатів глюкозооксидазної реакції



Серед перерахованих вище способів реєстрації найбільшого поширення набув фотометричний біохімічний метод, в якому молекули перекису водню під дією ферменту пероксидази розщеплюються з утворенням активної форми кисню – супероксид-аніону (O_2^-), який в свою чергу окисляє хромоген, що призводить до значної зміни спектру поглинання вихідного хромогену.



Велика популярність даного методу визначення глюкози зумовлена його високою специфічністю і простотою виконання. Метод можна реалізувати як із застосуванням звичайного фотометра, так і за допомогою автоматичних біохімічних автоаналізаторів.

Глюкозоксидазний метод визнаний сьогодні одним з найбільш точних кількісних методів визначення глюкози. В якості біологічного матеріалу використовується як сироватка крові, так і цільна кров. При роботі з останньою слід враховувати той факт, що при взятті капілярної крові частка сироватки (плазми) залежить від величини гематокриту, що може негативно відбитися на точності результату. Тому при визначенні глюкози вищезазначеним методом більш доцільно використовувати сироватку крові пацієнта.

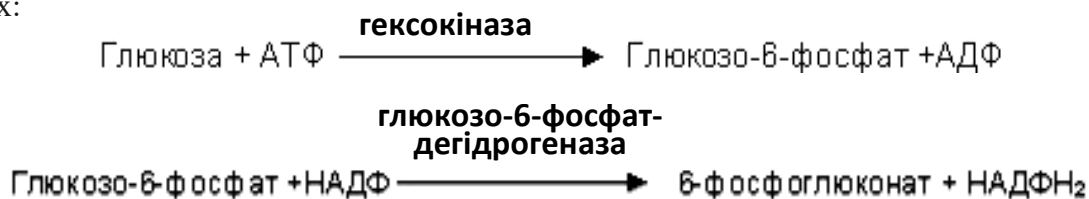
Окрім традиційного методу **фотометрування по кінцевій точці**, кілька років тому з'явилися набори, в яких реалізований **кінетичний метод фотометрування**. Його суть полягає в тому, що при певному співвідношенні активностей глюкозоксидози та пероксидази, швидкість утворення фарбованої сполуки деякий час після внесення проби в робочий розчин буде пропорційна концентрації глюкози в пробі. Перевага такого методу полягає в тому, що результат не залежить від наявності в пробі інших сполук, оскільки поглинання останніх стабільне в часі. Проте він передбачає застосування кінетичного фотометра, напівавтоматичних аналізаторів або автоматичних біохімічних аналізаторів.

Концентрацію глюкози цільної крові зручно вимірювати приладами, робота яких заснована на **амперометричному принципі вимірювання**, за допомогою спеціальних ферментних датчиків. Перекис водню – вкрай нестабільна хімічна сполука, яка може служити джерелом заряджених частинок. Саме це й використовується в ферментних датчиках мембранного типу або електрохімічних елементах портативних глюкометрів.

Слід пам'ятати й про недоліки глюкозоксидазного методу. По-перше, перекис водню і супероксид аніон-радикал, які утворюються, можуть окисляти не тільки хромоген, а й інші речовини, присутні в біологічних рідинах: аскорбінову кислоту, сечову кислоту, білірубін. При цьому, відповідно, частка перекису, яка бере участь в окисленні хромогену, знижується, що призводить до заниження результату по глюкозі. По-друге, цей метод зберігає лінійність, як правило, до концентрації глюкози не вище 20-30 ммоль/л.

Гексокіназний метод

Гексокіназний метод також складається з двох послідовних реакцій, але зовсім інших:



Результати реєструються за світлопоглинанням НАДФ-Н (довжина хвилі 340 нм).

Цей метод є високоспецифічним і не дає реакцій з іншими компонентами сироватки крові. Він вважається референтним для визначення глюкози.

Гексокіназний метод (на відміну від глюкозоксидазного) зберігає лінійність до концентрації глюкози 50 ммоль/л, що дозволяє його рекомендувати, передусім, для ендокринологічних диспансерів та клінік з ендокринологічними відділеннями.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Структура та біологічна роль вуглеводів.
2. Метаболізм глюкози.
3. Шляхи регуляції обміну вуглеводів.
4. Біохімічні показники обміну вуглеводів в нормі та при патології.
5. Методи визначення глюкози у сироватці крові та сечі.

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 1

Дата

1. Визначення глюкози глюкозооксидазним методом

Принцип методу:

Глюкоза в присутності глюкооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню. Останній, в присутності пероксидази, вступає в реакцію з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну червоно-фіо-летового кольору, кількість якого визначається фотометрично.

Лінійність методу: 0,05–27,7 ммоль/л

Нормальні значення: капілярна кров – 3,38–5,55 ммоль/л
сироватка, плазма – 4,22–6,11 ммоль/л
сеча – 0,0–1,11 ммоль/л

Концентрація глюкози стабільна при температурі +2 – +8⁰ С протягом 24 год. (якщо сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хв. після забору крові!).

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр з довжиною хвилі 540 нм та оптичного шляху 10 (5) мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 3) Колба об'ємом 500 мл
- 4) Сироватка крові, цільна кров або сеча
- 5) Фізіологічний розчин
- 6) Буферний розчин (рН 7,2 – 7,4)
- 7) Розчин ферментів та хромогену (глюкозооксидаза, пероксидаза, 4-амінофена-зон, стабілізатори)
- 8) Антикоагулянт – суха суміш натрію оксалату та натрію хлориду
- 9) Калібратор – калібрувальний розчин глюкози, 10,0 ммоль/л.

Приготування робочих розчинів:

Розчин антикоагулянту. В колбу ємністю 500 мл перенести вміст пакету з антикоагулянтом, додати 400 мл дистильованої води, перемішати до повного розчинення кристалів солей. При необхідності розчин профільтрувати. Готовий розчин стабільний не менше місяця при температурі +2-+8⁰ С.

Буферний розчин та розчин ензимів готові до використання у випадку проведення аналізу з біреагентом. Для приготування монореагенту розчин буферу та ензиму змішують у співвідношенні 1:1. Розчин стійкий при зберіганні при температурі +2-+8⁰ С.

Проведення аналізу:

Сироватка або плазма крові, сеча.

Аналіз проводиться згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірці:	Варіант з використанням біреагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуваний матеріал	0,02 мл	--	--
Калібратор	--	0,02 мл	--
Фізіол. розчин	--	--	0,02 мл
Буферний розчин	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Розчин ферменту	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

Цільна кров. Аналіз проводиться з використанням антикоагулянту. Для отримання плазми 0,1 мл цільної капілярної крові змішують з 0,9 мл розчину антикоагулянту та центрифугують 10 хв. при 2000 об/хв. для осадження еритроцитів. Для дослідження використовують надосадкову рідину. Калібрувальний розчин глюкози розводять фізрозчином в 10 разів (до 0,1 мл калібрувального розчину 10 ммоль/л додають 0,9 мл фізрозчину).

Аналіз проводять згідно таблиці 2.

Таблиця 2

Відміряти у пробірці:	Варіант з використанням біреагенту		
	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуваний матеріал	0,2 мл	--	--
Калібратор	--	0,2 мл	--
Фізіол. розчин	--	--	0,2 мл
Буферний розчин	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
Розчин ферменту	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати 20 хв. при температурі 25°C або 12 хв. при температурі 37°C. Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос}}$) і калібрувальної ($E_{\text{каліб}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Вміст глюкози в досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом (калібратором) по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація глюкози у досліджуваній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{каліб}}$ – оптична щільність калібрувальної проби;

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація глюкози в калібраторі (10 ммоль/л)

При вмісті глюкози в пробі понад 27,7 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести у 5 разів фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на 5.

Клініко-діагностичне значення.

На вміст глюкози у крові впливають різноманітні фізіологічні та патологічні процеси. Збільшення концентрації глюкози у крові (гіперглікемія) спостерігається при наступних станах: цукровому діабеті, гострому панкреатиті, панкреатичних цирозах, токсичному, механічному або травматичному подразненні центральної нервової системи, підвищенні гормональної діяльності щитовидної залози, кори та мозкового шару наднирників, гіпофізу. Також відмічається аліментарна гіперглікемія, яка розвивається після прийому їжі, багатой вуглеводами. Зменшення рівня глюкози відмічається при передозуванні інсуліну, захворюваннях нирок, поганому всмоктуванні вуглеводів у тонкому кишечнику, недостатній гормональній діяльності перерахованих вище залоз внутрішньої секреції, інколи при серцевій недостатності. Незбалансована дієта, гіперфункція острівців Лангерганса підшлункової залози, а також при отруєння фосфором, бензолом і хлороформом також викликає зниження рівня глюкози у крові.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л

Висновок:

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім описаного визначення глюкози за допомогою ФЕК, паралельно виконується її визначення на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Властивість глюкози, що лежить в основі ортолуїдинового методу:

- A. Участь в окисно-відновній реакції
- B. Розчинність у воді
- C. Поляризація
- D. Утворення полімерів
- E. Утворення стереоізомерів

2. Які вуглеводи всмоктуються в кров?

- A. Мальтоза
- B. Клітковина
- C. Глюкоза

- D. Глікоген
 - E. Лактоза
- 3. Який світлофільтр використовується в глюкозоксидазному методі?**
- A. Синій
 - B. Зелений
 - C. Жовтий
 - D. Червоний
 - E. Фіолетовий
- 4. Перетравлення вуглеводів в основному відбувається в:**
- A. Печінці
 - B. Шлунку
 - C. Стравоході
 - D. Товстому кишечнику
 - E. Тонкому кишечнику
- 5. Підвищення глюкози в крові – це:**
- 1. Гіпопротеїнемія
 - 2. Гіпоглікемія
 - 3. Гіперпротеїнемія
 - 4. Гіперглікемія
 - 5. Глюкозурія
- 6. Рівень глюкози в крові знижує гормон:**
- A. Глюкогон
 - B. Адреналін
 - C. Тіроксин
 - D. Інсулін
 - E. Норадреналін
- 7. Анаеробний шлях розпаду глюкози закінчується утворенням:**
- A. Води
 - B. Молочної кислоти
 - C. Піровиноградної кислоти
 - D. Углекислого газу
 - E. Оцтової кислоти
- 8. Основне всмоктування вуглеводів відбувається у:**
- A. Ротовій порожнині
 - B. Тонкому кишечнику
 - C. Шлунку
 - D. Стравоході
 - E. Печінці
- 9. Норма вмісту глюкози в крові ортотолуїдиновим методом:**
- A. 12-32 г/л
 - B. 0,1- 0,68 ммоль/(год·л)
 - C. 20-160 г/(год·л)
 - D. 3,33-5,55 ммоль/л
 - E. 16-64 од.
- 10. Які реактиви потрібні для глюкозооксидазного методу?**
- A. Буферний розчин
 - B. 10 % розчин натрію гідроксиду
 - C. 10 % розчин оцтової кислоти

- D. Розчин Люголя
- E. 0,1 % розчин крохмалю

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142).

ЗАНЯТТЯ № 2

1. ТЕМА: Вивчення вуглеводного обміну методом навантажень. Лабораторні критерії діагностики цукрового діабету

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Цукровий діабет є поширеним захворюванням, вчасна лабораторна діагностика якого має важливе значення. Глюкозотолерантний тест проводиться з метою виявлення латентних форм цукрового діабету та наявності толерантності до глюкози на початкових етапах. При цукровому діабеті рівень глюкози натщесерце буває підвищеним, зростання глікемічної кривої відбувається повільно, зниження затягується, гіпоглікемічна фаза за час проведення тесту не спостерігається. Навантаження глюкозою супроводжується у більшості випадків глюкозурією. Чим більш чітко виражений цукровий діабет, тим пізніше досягається максимум глікемії та тим він вище.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Використовуючи знання про способи регуляції рівня глюкози в крові, оцінити стан вуглеводного обміну за допомогою тестів толерантності до глюкози методами навантажень.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Розрізняють дві основні групи **гіперглікемій**:

1. **Інсулярна** – пов'язана з недостатнім вмістом інсуліну або обумовлена неефективністю його дії.

2. **Неінсулярна** (позаінсулярна) – не залежить від впливу інсуліну. Найбільш істотне значення в її формуванні мають:

- гальмування синтезу глікогену
- посилений розпад глікогену
- підвищений глюконеогенез
- зниження утилізації глюкози тканинами

Гальмування синтезу глікогену або його посилений розпад найчастіше пов'язаний з дифузними ураженнями печінки феохромоцитомі (гіперфункція мозкового шару надниркових залоз – гіпекатехоламінемія).

Підвищений глюконеогенез та зниження утилізації глюкози тканинами під впливом гормональних антагоністів інсуліну (*глюкокортикоїдів, соматотропіну, глюкагону, тироксину* та ін.) спостерігається при синдромі Іценко-Кушинга (гіперпродукція кортизолу), акромегалії (гіперпродукція соматотропного гормону), тиреотоксикозі, глюкагономах.

Виділяють також гіперглікемії центрального походження – наслідок механічного, токсичного, гіпоксичного та ін. збудження нейронів «цукрового центру», який розташований на дні IV шлуночку довгастого мозку. Неврогенні гіперглікемії спостерігаються при травмах головного мозку, тромбозі мозкових судин, внутрішньочерепному крововиливі, а також при тяжкій інтоксикації, лихоманці, енцефалопатіях та інших станах. У цих випадках рівень глюкози підвищується несуттєво – максимум до 10 ммоль/л. Різновидом неврогенних гіперглікемій є емоційна.

Зниження вмісту глюкози в крові (**гіпоглікемія**) може бути обумовлене абсолютним (гіперплазія β -клітин острівців Лангерганса) або відносним (дегенерація α -

клітин острівців Лангерганса) підвищенням рівня інсуліну, який інгібує глікогеноліз, гальмує глюконеогенез та прискорює трансмембранний транспорт глюкози в клітини.

Первинна гіперінсулінемія спостерігається, насамперед, при інсулін-продукуючих пухлинах острівців підшлункової залози (інсулінома – найчастіша функціонуюча ендокринна пухлина підшлункової залози, частота якої за даними деяких досліджень, складає до 60% і більше) і синдромі Золінгера-Елісона (гастронома).

Непанкреатична гіпоглікемія спостерігається в результаті порушення балансу між вираженістю процесів утворення та розпаду глікогену в печінці при гострих і хронічних гепатитах, цирозах, гострій і підгострій дистрофії печінки, алкогольній інтоксикації, отруєнні миш'яком, тривалій механічній жовтяниці, первинному або метастатичному раку печінки.

Гіпоглікемія супроводжує багато ендокринних захворювань, в тому числі гіпофізарну і надниркову недостатність, гіпофункцію щитовидної залози.

Вона може виникнути також і при цукровому діабеті внаслідок різкого зниження рівня глюкози при неправильно підібраній терапії(!).

Описані випадки транзиторної гіпоглікемії центрального походження – наслідки перенесених психологічних травм, енцефаліту, субарахноїдального крововиливу, пухлини мозку.

Зустрічається й спонтанна гіпоглікемія, що виникає після короточасної аліментарної гіперглікемії, викликаній частим вживанням багатої вуглеводами їжі. Найчастіше вона відзначається у астеників, емоційно нестійких осіб, для яких характерна підвищена чутливість до інсуліну.

Особлива форма гіпоглікемії з кетозом виявляється у новонароджених дітей внаслідок дефіциту аланіну або при непереносимості лейцину, який індукує секрецію інсуліну. Також гіпоглікемічні стани спостерігаються у дітей, народжених від жінок хворих на цукровий діабет. Причиною цього є те, що підвищений вміст глюкози в крові матері передається плоду і викликає у нього гіперплазію β -клітин острівців Лангерганса, що зберігається після народження і викликає посилену продукцію інсуліну.

Глюкозурія. При фізіологічному рівні глюкози в крові в сечі здорової людини вона не виявляється, оскільки після фільтрації в клубочках реабсорбується в проксимальних канальцях нефронів. Нирковий поріг для глюкози складає 7,8-9,0 ммоль/л. Тому при гіперглікемії вище цих значень глюкоза виявляється в сечі (**гіперглікемія з глюкозурією**).

Разом з тим, поява глюкози в сечі визначається не тільки її концентрацією в крові. Це залежить також від стану нирок, тобто відповідності процесів фільтрації та реабсорбції глюкози в них. В зв'язку з цим розрізняють 2 групи глюкозурій: гіперглікемічна і нормоглікемічна. Гіперглікемічна, як зазначалось вище, спостерігається при вираженій гіперглікемії. **Нормоглікемічна глюкозурія** пов'язана з порушенням реабсорбції глюкози в ниркових канальцях. Основними причинами її є інтоксикація ртуттю, окисом вуглецю, стрихніном, снодійними препаратами, хлороформом, морфіном та іншими сполуками. Також вона зустрічається при гломерулонефриті, хронічному пієлонефриті, нефросклерозі, нефротичному склерозі, вагітності.

Розрізняють також аліментарну глюкозурію, яка спостерігається після прийому великої кількості вуглеводів і зникає через 2-3 години.

Найчастіше стійка і виражена гіперглікемія спостерігається при цукровому діабеті.

Цукровий діабет – одна з найбільш серйозних проблем сучасної світової медицини. За останні 30 років відмічається різке зростання розповсюженості та чисельності захворювань на цукровий діабет в усьому світі, в першу чергу в промислово розвинутих країнах (5-6% населення). За даними ВООЗ, на сьогодні у світі нараховується 371 млн. хворих, а до 2025 року очікується 552 млн. хворих на цукровий діабет, з яких 80-90% будуть складати хворі на цукровий діабет другого типу.

За даними епідеміологічних досліджень останніх років в Україні зареєстровано близько 1,5 млн хворих на цукровий діабет (його поширеність складає понад 3000 хворих на 100 тис. населення) та існує наявна тенденція постійного збільшення числа хворих.

Однією з найбільш актуальних особливостей діабету в наш час є значне збільшення чисельності захворювань серед молодих людей працездатного віку (до 40 років) та, особливо, дітей.

Різноманітні ускладнення при цукровому діабеті є головною причиною інвалідизації хворих (найбільш ранньої серед усіх хронічних захворювань!), скорочення тривалості їх життя та високої летальності.

Цукровий діабет – це група метаболічних захворювань, що характеризується гіперглікемією (з глюкозурією та кетоацидозом або без них), порушенням всіх видів обміну, які є наслідком дефектів синтезу інсуліну чи зниженням чутливості до його дії або обох цих чинників. Хронічна гіперглікемія при діабеті супроводжується ураженням, дисфункцією та недостатністю різних органів та систем, зокрема, очей, нирок, нервової системи, серця та кровоносних судин.

Розрізняють 2 основних типи цукрового діабету: тип I (інсулінозалежний, ІЗЦД) і тип II (інсулінонезалежний, ІНЗЦД). Характерні симптомокомплекси у вигляді поліурії, полідипсії і втрати маси тіла спостерігаються при обох типах.

Виділяють також порушення толерантності до глюкози – проміжний етап між метаболічним станом здорових людей і хворих на цукровий діабет. Цей стан діагностується на підставі тривалої підвищеної концентрації глюкози в крові після попереднього вживання певної стандартної кількості вуглеводів.

Цукровий діабет I типу – це метаболічне захворювання, яке характеризується хронічною гіперглікемією, обумовленою зменшенням секреції інсуліну або практично повною її відсутністю. Причиною абсолютного дефіциту інсуліну є втрата бета-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. При цьому порушуються вуглеводний, ліпідний і білковий обмін.

Такий діабет частіше виявляють в дитячому або підлітковому віці. За сучасними уявленнями, виникнення захворювання пов'язане з вірусною інфекцією, неадекватною роботою імунної системи і спадковими причинами (успадковується не сам діабет, а тільки схильність до нього).

Найбільш характерними симптомами діабету I типу є аномальна спрага і сухість у роті, прискорене сечовипускання, нічне нетримання сечі, дефіцит енергії і крайня втома, постійне відчуття голоду, раптова втрата ваги, катаракта та порушення зору.

Діабет I типу діагностується за наявності цих симптомів у поєднанні з результатом аналізу, що вказує на високий рівень глюкози в крові.

Цукровий діабет II типу – це порушення вуглеводного обміну, спричинене переважною інсулінорезистентністю та відносною інсуліновою недостатністю або з переважним дефектом секреції інсуліну з інсулінорезистентністю.

Цей тип, як правило, розвивається у віці 30-40 років і більше у людей, що мають надмірну вагу. При цьому підшлункова залоза виробляє інсулін, але клітини організму не можуть правильно на нього реагувати, їх чутливість до інсуліну знижена. Через це глюкоза не може проникнути в тканини і накопичується в крові. Згодом при діабеті другого типу може знижуватися і продукція інсуліну, так як довго існуючий високий рівень глюкози крові згубно діє на клітини, які його виробляють.

Симптомами цукрового діабету II типу є прискорене сечовипускання, надмірна спрага, надзвичайно сильне почуття голоду, розпливчастість зору, дефіцит енергії і крайня втома, оніміння та поколювання в руках і ногах, повільне загоєння ран і рецидивні інфекції.

Багато людей з діабетом II типу не знають про свій стан протягом тривалого часу, тому що симптоми хвороби зазвичай не такі очевидні, як симптоми діабету I типу.

Основні діагностичні критерії цукрового діабету базуються на дослідженні цукру крові й наявності клінічних симптомів.

Клінічні симптоми цукрового діабету – це поліурія; полідипсія; поліфагія; втрата маси тіла; нічне нетримання сечі; сухість слизових оболонок рота; сверблячка шкіри і слизуватих; підвищена нервова збудливість; головний біль; біль в черевній порожнині, нудота, блювота (особливо при кетоацидозі); діабетичний рум'янець; запах ацетону з рота; стоматит, в т.ч. ангулярний; часті інфекції; фурункульоз, ячмені; порушення зору.

Лабораторні – гіперглікемія; глюкозурія (зазвичай з'являється при рівні глікемії більше, ніж 8,88 ммоль/л); кетонурія, підвищений рівень глікозильованого гемоглобіну; наявність аутоантитіл до антигенів бета-клітин, до інсуліну, рівень С-пептиду.

Діагностика цукрового діабету базується на наступних дослідженнях:

1. Аналіз рівня глюкози в плазмі натще. Перевіряє рівні глюкози натще. Для його проведення необхідно не їсти і не пити нічого, крім води, протягом 8 годин перед аналізом. Проведення аналізу зазвичай призначається на ранкові години, до сніданку.

2. Вимірювання рівня глюкози в плазмі в будь-який момент без по-передньої підготовки до тесту. Цей аналіз, зазвичай, проводиться тоді, коли є очевидні симптоми діабету (несподівана втрата ваги, крайня втома та ін.).

3. Пероральний тест на толерантність до глюкози (ПТТГ). Перевіряє реакцію організму на цукрове навантаження. Для проведення цього аналізу необхідно випити спеціальний солодкий напій. Рівень цукру в крові вимірюється до пиття і через кожні 30 хв. після нього протягом 2 годин.

4. Аналіз на глікований гемоглобін (HbA1c). Визначає середній рівень цукру в крові за останні 2-3 місяці. Для проведення цього аналізу не потрібно голодувати або пити що-небудь особливе.

Відмінності та особливості перебігу цукрового діабету I-го і II-го типів наведені в таблиці.

	Тип I	Тип II
патогенез	аутоімунне знищення β-клітин; нестача інсуліну	комбінований дефект секреції інсуліну та інсулінорезистентності
епідеміологія (по Європі)	0,02–0,4 %	1–3 %
етіологія	аутоімунна деструкція β-клітин панкреатичних острівців	невідома, недостатня інсулінова секреція або інсулінорезистентність
вік виникнення	дитячий вік	> 30 років
вага тіла	зазвичай знижена	нормальна, часто надлишкова
початок захворювання	швидкий	повільний
схильність до кетоацидозу	висока	низька
ожиріння	рідко	часто
ендогенний інсулін	низький або відсутній	норма чи підвищений
антитіла до клітин острівців Лангерганса	наявні	відсутні
генетична залежність	полігенна	сильна
лабораторна діагностика	гіперглікемія, глюкозурія, кетонурія, кетоацидоз. Додаткові дослідження – низький рівень інсуліну і С-пептиду	гіперглікемія, глюкозурія. Інсулін на початку захворювання високий або в нормі, пізніше – знижується. Кетоацидоз – рідко
лікування	екзогенний інсулін, дієта	дієта, пероральні гіпоглікемічні ліки

В наведеній нижче таблиці зазначені результати визначення рівня глікемії та їх інтерпретація.

Тест	Результат	Діагноз
Рівень глюкози в плазмі венозної крові натще	> 4,0–< 6,1 ммоль/л	Норма
	≥ 6,1–< 7 ммоль/л	Порушення глікемії натще (предіабет)
	≥ 7 ммоль/л.	ЦД, що потребує підтвердження повторним тестом в інший день
Випадковий рівень глюкози капілярної крові	≥ 5,6–< 11,1 ммоль/л	Для встановлення діагнозу зробити тест на визначення рівня глюкози в плазмі венозної крові натще
	≥ 11,1 ммоль/л із наявністю класичних симптомів гіперглікемії	ЦД, що потребує підтвердження повторним тестом в інший день
Пероральний глюкозотолерантний тест (ГТТ)	< 7,8 ммоль/л	Норма
	≥ 7,8–< 11,1 ммоль/л	Порушення толерантності до глюкози (ПТГ, предіабет)
	≥ 11,1 ммоль/л	ЦД, що потребує підтвердження повторним тестом в інший день
Глікозильований гемоглобін HbA1c (як бажаний тест)	≥ 6,5 %	ЦД, що потребує підтвердження повторним тестом в інший день

Глюкозотолерантний тест (ГТТ) проводиться для діагностики прихованих порушень вуглеводного обміну. Обстеження показане у випадках, якщо зміст глюкози в крові натще коливається від норми до 7,0 ммоль/л, а також особам з виявленими факторами ризику розвитку цукрового діабету (цукровий діабет у близьких родичів, народження великого плоду, порушення толерантності до глюкози в анамнезі, епізодичні гіперглікемії і глюкозурії, ожиріння (індекс маси тіла > 27 кг/м²), клінічна симптоматика цукрового діабету на тлі нормоглікемії, наявність у пацієнта артеріальної гіпертензії, гіперхолестеринемії, особи, які тривалий час отримують діабетогенні препарати). Показання для тесту толерантності до глюкози можуть залежати від конкретного клінічного випадку.

Впродовж трьох діб перед проведенням ГТТ харчування людини має звичайний характер (з достатньою кількістю вуглеводвмісних продуктів). За 3 доби відмінюється прийом тіазидних діуретиків, контрацептивних препаратів, глюкокортикоїдів. При систематичному застосуванні будь-яких препаратів необхідно повідомити лікаря. Тест проводиться вранці натще після 12-годинного попереднього голодування.

При проведенні тесту визначають рівень глікемії натще. Потім обстежуваний впродовж 5 хв. приймає 75 г глюкози, розчиненої в 200-250 мл води (для дітей доза глюкози визначається з розрахунку 1,75 г на 1 кг маси тіла). Під час проведення тесту виключаються підвищене фізичне навантаження, паління, вживання їжі. Рівень глікемії визначається через 1 і 2 год. після прийому глюкози (в певних випадках через 30, 60, 90 та 120 хв.).

У здорової людини вже через 15 хв. після прийому глюкози спостерігається збільшення її вмісту в крові, яке між 30 і 60 хвилинами досягає максимальної величини. Потім починається зниження і до 120 хвилини вміст глюкози сягає вихідного рівня, яке відзначали натщесерце (чи з незначними відхиленнями в сторону підвищення або зниження). У хворих на цукровий діабет відзначається підвищений вихідний рівень глюкози і висока гіперглікемія (понад 8 ммоль/л) вже через годину після цукрового навантаження.

При проведенні ГТТ з **подвійним навантаженням глюкозою** другу порцію дають через 1,5 години після першої. У здорової людини другий пік гіперглікемії буде меншим, ніж перший, а у хворого на цукровий діабет він буде вище першого.

Глікемічна крива має три фази. Перша фаза зумовлена дією вегетативної нервової системи, коли рефлекс із слизової оболонки ротової порожнини, шлунка передається на симпатичні нервові волокна, після чого посилюються продукція адреналіну і розпад глікогену печінки. Початок підвищення рівня глюкози в крові спостерігається через 10-15 хв. від початку навантаження.

Друга фаза характеризується максимальним підйомом, який відмічається на 60 хв. після навантаження, і в нормі рівень глюкози на цей час більший від вихідного на 35-80%. Ця фаза зумовлена всмоктуванням глюкози в кров із кишок.

Третя фаза характеризується зниженням вмісту глюкози, і в нормі через 2,5-3 год. може спостерігатися повернення рівня глюкози до вихідного або близького до нього за значенням.

Розрізняють декілька основних видів глікемічних кривих (зображені на схемі нижче).

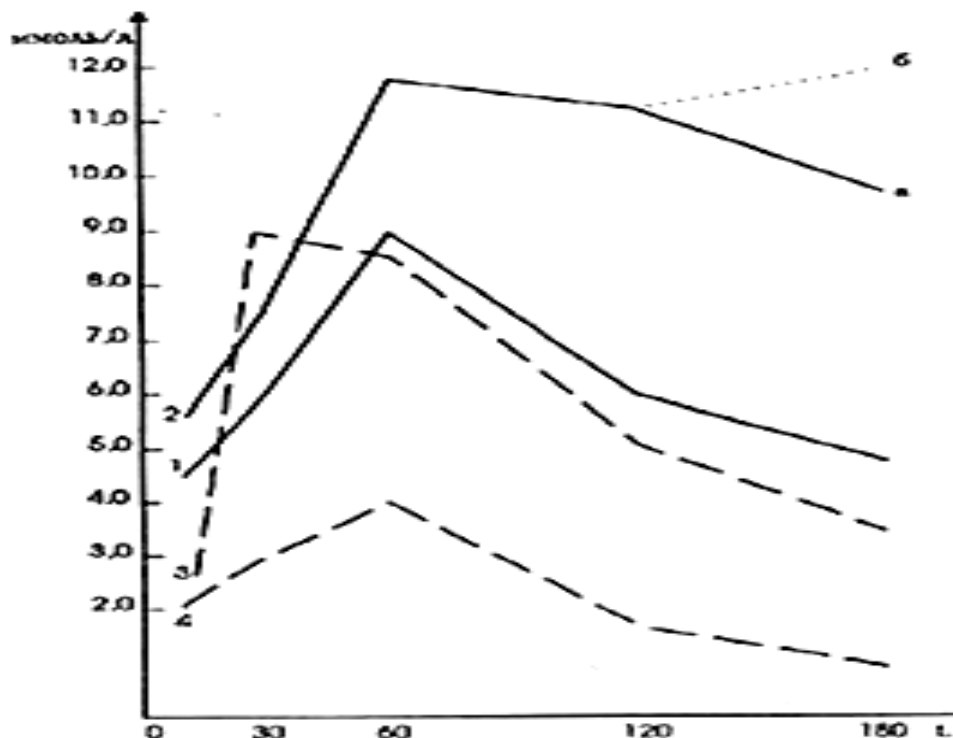
1) **норма**

2) **діабетодіна** – крива з високим підйомом, яка через 2-3 години після навантаження не повертається до вихідних значень (2а – простий ГТТ, 2б – подвійний ГТТ). Спостерігається при цукровому діабеті, а також феохромоцитомі, акромегалії, хворобі Іценка-Кушінга та ін.

3) **іритативна** – крива з високим підйомом та швидким падінням. Такі криві спостерігаються при гіпертиреозі, глікогенозах, сильних емоційних або токсико-інфекційних станах

4) **торпідна** – крива з низьким підйомом і швидким або повільним зниженням. Спостерігається при інсуліномах, патології печінки, мікседемі та ін.

Для правильного трактування результатів проведення ТТГ найбільш важливий саме характер глікемічної кривої, хоча в деяких випадках рекомендується також розраховувати й певні коефіцієнти:



коефіцієнт Бодуена (відношення максимального підйому глюкози до її вихідного значення, тобто натще). В нормі він дорівнює 1,3-1,5. Підйом вище 1,5 означає патологію

коефіцієнт Рафальського (відношення цифри мінімального значення глюкози до її вихідного значення, натще). В нормі він дорівнює 0,9-1,04.

В 2011 р. ВООЗ в якості діагностичного критерію цукрового діабету схвалила визначення рівня **глікозильованого гемоглобіну** (HbA1c > 6,5%). Перевага визначення HbA1c полягає в тому, що цей тест, на відміну від ГТТ, може бути проведений у будь-який час, відзначається менша варіабельність його значень у різні дні (залежність від стресів, різних захворювань і т.п.), а за точністю він не поступається вимірюванню глюкози крові.

Для диференціальної діагностики цукрового діабету I і II типів проводять визначення **C-пептиду**. C-пептид – це білок, що відщеплюється від молекули проінсуліну в процесі синтезу інсуліну. Кількість циркулюючого C-пептиду еквівалентна кількості інсуліну. Тому за його кількістю можна умовно оцінити стан збереження інсуліносекреторної здатності бета-клітин підшлункової залози. При цукровому діабеті I типу концентрація C-пептиду в крові низька або він відсутній взагалі, при цукровому діабеті II типу рівень цього білка може тривалий час залишатися в межах нормальних значень або навіть бути підвищеним (гіперінсулінемія).

В багатьох випадках для диференціальної діагностики цукрового діабету I і II типів у хворих, які не отримували інсулінотерапію, можна використовувати визначення **імунореактивного інсуліну** (ІРІ). Визначення ІРІ використовується для оцінки ступеня інсулінорезистентності й функціональної активності бета-клітин за індексами різних математичних моделей.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

5.1 ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Гіпер- та гіпоглікемія, глюкозурія.
2. Цукровий діабет I і II типів, особливості патогенезу
3. Схеми проведення навантажень глюкозою (однократна, двократна)
4. Патолофізіологічні механізми, що обумовлюють динаміку змін концентрації глюкози після глюкозотолерантного тесту
5. Глікемічні коефіцієнти Бодуена та Рафальського
6. Клініко-діагностичне значення проведення глюкозотолерантного тесту

5.2 ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 2

Дата

1. Проведення глюкозотолерантного тесту

Вранці натщесерце у хворого беруть кров з пальця для визначення вмісту глюкози. Потім йому дають випити приготовлений заздалегідь розчин 50 г глюкози у 200 мл теплої кип'яченої води. Якщо глюкоза замінюється цукром, необхідно виходити з розрахунку 1,5 г цукру на 1 кг маси тіла. Досліджуваний пацієнт повинен випити розчин протягом 5 хв. Кров для дослідження беруть через 30, 60 і 120 хв. після проведення навантаження глюкозою.

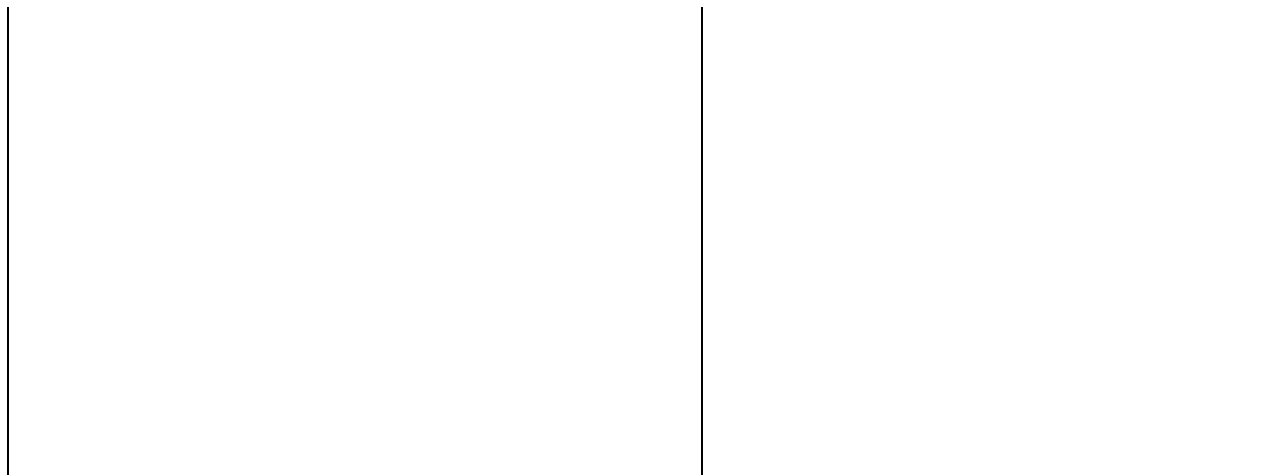
Завдання 1. Провести глюкозотолерантний тест, дані занести в таблицю, для отриманих результатів розрахувати коефіцієнти Бодуена та Рафальського, побудувати глікемічні криві у вигляді графіка та зробити висновки

№ п/п	Час після навантаження	Оптична щільність	Абсолютне значення, ммоль/л
	натщесерце		
	60 хвилин		
	120 хвилин		
	натщесерце		

	60 хвилин		
	120 хвилин		

Розрахунки коефіцієнтів

Графіки глікемічних кривих



Висновок.

Завдання 2. Проаналізувати результати проведення глікемічного профілю

№ п/п	Час взяття крові	Вміст глюкози
1	08.00	
	12.00	
	16.00	
2	08.00	
	12.00	
	16.00	
3	08.00	
	12.00	
	16.00	
4	08.00	
	12.00	
	16.00	

Висновок.

Клініко-діагностичне значення.

Глюкозотолерантний тест проводиться з метою виявлення латентних форм цукрового діабету і наявності толерантності до глюкози на початкових етапах. При цукровому діабеті рівень глюкози натщесерце буває підвищеним, зростання глікемічної кривої відбувається повільно, зниження затягується, гіпоглікемічна фаза за час проведення тесту не спостерігається. Навантаження глюкозою супроводжується у більшості випадків глюкозурією. Чим більш чітко виражений цукровий діабет, тим пізніше досягається максимум глікемії та тим він вище. Ураження печінки характеризується швидким зростанням глікемічної кривої в результаті ослаблення асиміляційної здатності печінки. Однак максимальний підйом не досягає таких величин, як при цукровому діабеті. Захворювання щитоподібної залози, які пов'язані з її гіперфункцією, характеризуються глікемічними кривими з більш швидким, порівняно з нормою, зростанням рівня глюкози. Використання двократного навантаження глюкозою, навантаження адреналіном, інсуліном та комбінованих тестів з інсуліном, глюкагоном, кортизоном та АКТГ дозволяють виявити приховані форми цукрового діабету, порушення функції печінки та ендокринних залоз.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Проводиться визначення основних діагностичних маркерів цукрового діабету на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

- 1. Для діагностики яких захворювань важливо мати об'єктивні дані про рівень глюкози в крові**
 - А. Новоутворення головного мозку
 - В. Новоутворення підшлункової залози та наднирників
 - С. Цукровому діабеті
 - Д. Всі відповіді правильні
- 2. Які показники глюкози характерні для цукрового діабету**
 - А. 7,2 ммоль/л
 - В. 6,7 ммоль/л
 - С. Більш як 8,0 ммоль/л
 - Д. 5,5 ммоль/л
- 3. Яка концентрація глюкози у крові через 2 години після перорального введення глюкози при проведенні стандартного глюкозотолерантного тесту характерна для порушення толерантності до глюкози**
 - А. 5,0 – 8,0 ммоль/л
 - В. 12,0 – 14,0 ммоль/л
 - С. 8,0 – 11,0 ммоль/л
 - Д. 8,0 – 13,0 ммоль/л
- 4. При якому з перерахованих захворювань відзначається збільшення концентрації глюкози в крові**
 - А. Гострий панкреатит
 - В. Травма, пухлина головного мозку
 - С. Отруєння ртуттю або окисом вуглецю

- D. Всі відповіді правильні
- 5. При якій концентрації глюкози в крові після багатого вуглеводами сніданку слід проводити глюкозотолерантний тест:**
- A. 5,5 – 6,0 ммоль/л
 - B. 5,5 – 7,2 ммоль/л
 - C. 7,2 – 7,6 ммоль/л
- 6. По яким показникам оцінюється крива, отримана при проведенні глюкозотолерантного тесту:**
- A. Початковий вміст глюкози
 - B. Швидкість і висота підйому
 - C. Тривалість глікемії та характер її зниження
 - D. Всі відповіді правильні
- 7. Які причини сприяють виникненню гіперглікемії:**
- A. Значний прийом вуглеводів з їжею
 - B. Емоційне та психологічне напруження
 - C. Фізичне навантаження та паління
 - D. Всі відповіді правильні
- 8. При якій формі цукрового діабету вміст кетонових тіл у крові і сечі може підвищуватися**
- A. Латентний діабет
 - B. Потенційний діабет
 - C. Клінічний діабет, важка форма
 - D. Всі відповіді правильні
- 9. По яких показниках оцінюється крива, отримана при проведенні глюкозотолерантного тесту:**
- A. Початковий вміст глюкози
 - B. Швидкість і висота підйому
 - C. Тривалість глікемії та характер її зниження
 - D. Всі відповіді правильні
- 10. Через які проміжки часу беруть кров для дослідження глюкози при проведенні глюкозотолерантного тесту:**
- A. Натщесерце
 - B. Через 1 годину
 - C. Через 2 години
 - D. Всі відповіді правильні

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 3

1. ТЕМА: Метаболізм фруктози, галактози, глікогену та лабораторна діагностика порушень їх метаболізму.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Переважає більшість тваринних і рослинних клітин у нормі знаходяться в аеробних умовах, і тому вуглеводи окислюються повністю до CO_2 та H_2O в циклі Кребса. При цьому з глюкози вивільняється вся біологічно доступна вільна енергія. Крім того, в організмі існує ще один шлях окислення вуглеводів – прямий пентозофосфатний цикл. Знання аеробного та пентозофосфатного шляхів окислення глюкози дуже важливе для майбутнього лаборанта в зв'язку з можливою

корекцією цих процесів і розуміння їх ролі в енергообміні та пластичних процесах в клітині.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Вивчити теоретичний матеріал по проміжному обміну вуглеводів. Вміти визначати піруват в біологічних рідинах.

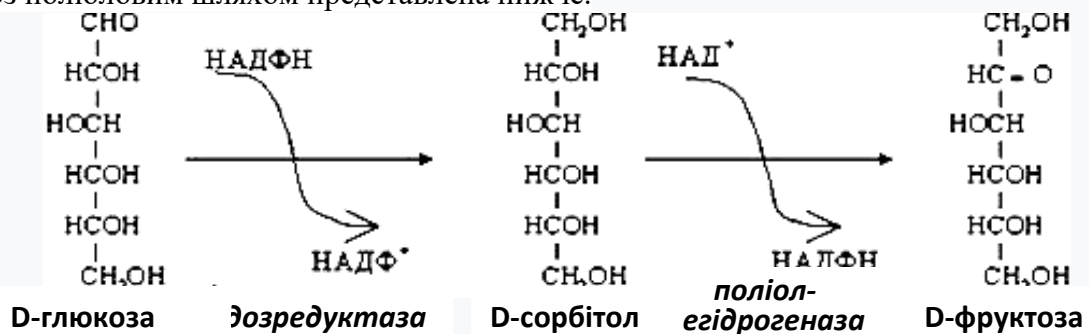
4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Оскільки в кишечнику всмоктуються всі поступаючі з їжею моносахариди (фруктоза, галактоза, маноза і т.п.), то перед організмом постає завдання перетворити дані гексози в глюкозу для її використання клітинами. Мета цього процесу – утворення єдиного субстрату для подальших реакцій метаболізму (α -D-глюкози), що дозволяє значно заощадити ресурси клітин, не утворюючи паралельні ферментативні шляхи для метаболічних перетворень кожного моносахариду окремо. Фруктоза та галактоза включаються в обмінні процеси шляхом їх перетворення на фосфорильовані ефіри глюкози або її метаболітів – інтер-медіатів гліколізу. Реакції перетворення цих моносахаридів в глюкозу протікають в епітелії кишечника і, в основному, в гепатоцитах. У новонароджених дітей деякий час навіть при гіпоглікемії в крові відзначається відносний надлишок фруктози і галактози, що пов'язано з функціональною незрілістю їх печінки.

При дефекті будь-якого з ферментів, які забезпечують перетворення зазначених гексоз в глюкозу, певний моносахарид накопичується в крові, що спричиняє виникнення відповідного патологічного стану (фруктоземія, галактоземія).

Метаболізм фруктози.

Основним джерелом фруктози в організмі людини є її надходження з продуктами харчування. Вона входить до складу дисахариду сахарози, яка гідролізується в кишечнику ферментом ентероцитів сахарозою до двох гексоз (глюкози і фруктози). Окрім цього, певна її кількість може синтезуватись в організмі з глюкози. Синтез ендогенної фруктози з глюкози відбувається в так званому поліоловому метаболічному шляху через утворення проміжної сполуки – шестиатомного спирту *сорбітолу* (синонім – глюцит). За певних обставин реакції можуть протікати і в зворотньому напрямку. Схема взаємоперетворення гексоз поліоловим шляхом представлена нижче.



Поліоловий шлях має важливе фізіологічне значення, передусім, для сперматозоїдів (фруктоза є енергетичним джерелом забезпечення їх руху (за рахунок здатності мітохондрій цих клітин окислювати фруктозу в процесі фруктолізу). Тому концентрація фруктози в сім'яній рідині досягає 10 ммоль.

Негативна клінічна значимість поліолового шляху (при надмірному його посиленні) проявляється, насамперед, в відношенні клітин більшості інсулін-незалежних тканин, в які глюкоза надходить за градієнтом концентрації. Це – в першу чергу, нейрони, а також кристалик ока, ендотелій, клітини клубочків нирок і т.п. При вираженій та (особливо) тривалій гіперглікемії, збільшується надходження глюкози в дані клітини і, відповідно, різко зростає швидкість синтезу сорбітолу в них та супутні метаболічні зрушення, що є біохімічною основою розвитку характерних діабетичних ускладнень – нейропатії, ангіопатії, ретинопатії, катаракти, нефропатії.

В загальному, включення вільної фруктози в метаболізм клітин може відбуватись шляхом її фосфорилування під дією одного з двох ферментів – неспецифічної **гексокінази** (з утворенням D-фруктозо-6-фосфату) або специфічної **фруктокінази** (з утворенням D-фруктозо-1-фосфату).

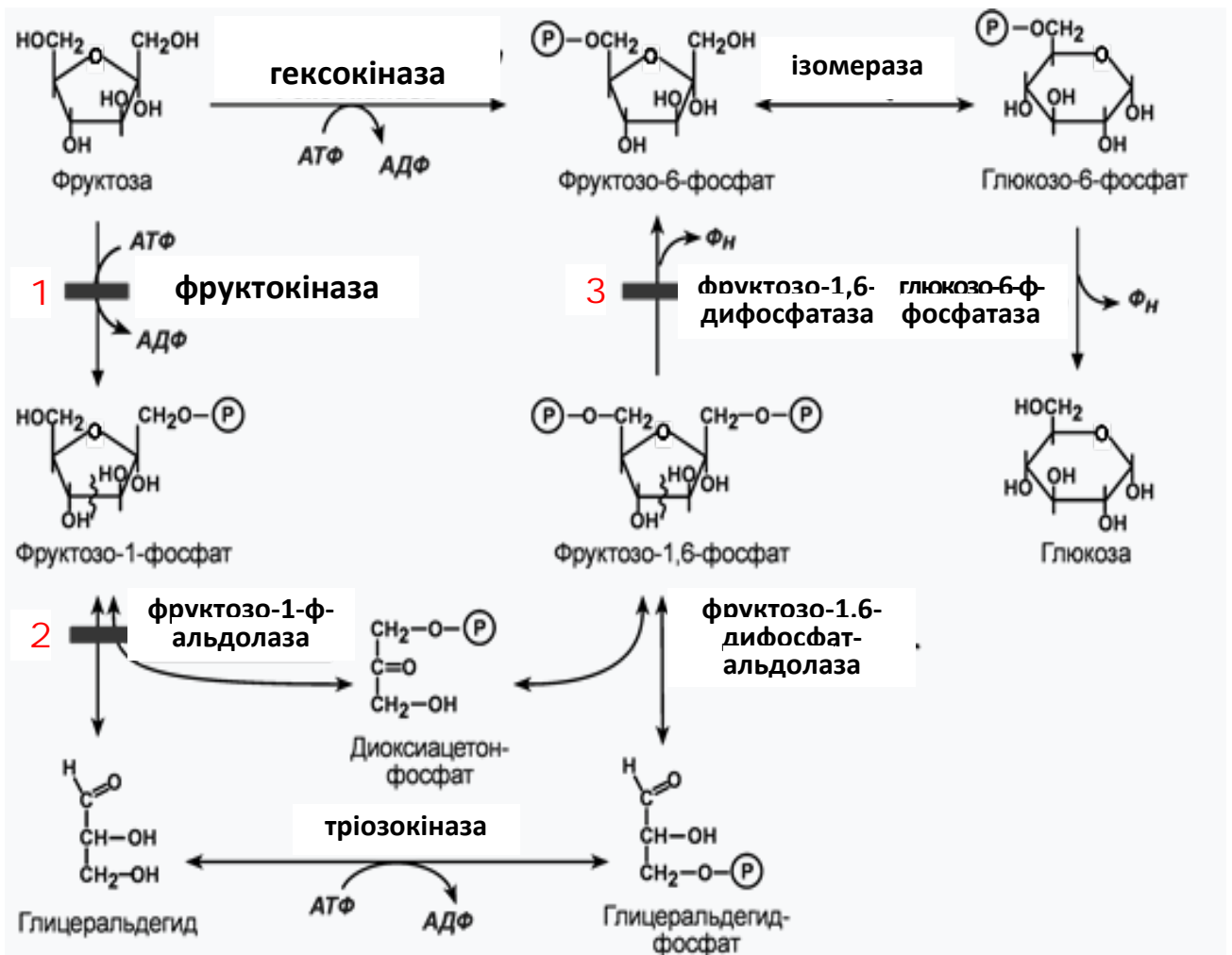
Гексокіназа – фермент, присутній в клітинах усіх тканин. Продукт її дії на фруктозу (D-фруктозо-6-фосфат) є звичайним проміжним метаболітом гліколізу та глюконеогенезу, тому подальші його перетворення відбуваються одним з цих двох шляхів (в залежності від потреб конкретної клітини на даний момент). Проте в більшості тканин гексокіназа має низьку спорідненість до фруктози (особливо за наявності в клітині глюкози), тому загалом цим шляхом в них фосфорилується лише незначна її кількість. Досить активно гексокіназний шлях метаболізму фруктози реалізується лише в м'язах і нирках. Це пояснюється практичною відсутністю в клітинах цих органів фруктокінази, тому фруктоза в них перетворюється в фруктозо-6-фосфат, який відразу надходить в реакції гліколізу або синтезу глікогену.

Фруктокіназа – фермент, виявлений в печінці, нирках і кишечнику. Він проявляє абсолютну специфічність до фруктози, тому інсулін не впливає на його активність. Продукт дії фруктокінази (фруктозо-1-фосфат) не може одразу вступити в гліколіз (через відсутність відповідного ферменту неможлива його ізомеризація у фруктозо-6-фосфат з наступним утворенням фруктозо-1,6-дифосфату). Замість цього фруктозо-1-фосфат зразу розщеплюється фруктозо-1-фосфатальдолазою (альдолаза В) навпіл на дві тріози – діоксиацетон-фосфат і гліцеральдегід, який фосфорилується при взаємодії з АТФ під дією тріозокінази. Таким чином обидві тріози переходять на шлях гліколізу, де використовуються для енергоутворення, або глюконеогенезу – для ресинтезу глюкози. В печінці фруктоза включається, головним чином, в другий шлях. Крім цього, частина дигідроксиацетон-3-фосфату може відновлюватися до гліцерин-3-фосфату і брати участь в синтезі триацилгліцеролів.

Оскільки в цьому випадку (участь фруктокінази) утворення фосфотріоз здійснюється в обхід двох регуляторних реакцій гліколізу (гексокіназної і, особливо, фосфотріозкіназної), які обмежують швидкість даного процесу в цілому, обмін фруктози відбувається значно швидше, ніж глюкози.

Фруктокіназа є інсулін-незалежним ферментом. Тому перетворення фруктози в піруват і ацетил-SКоА у діабетиків відбувається швидше, ніж глюкози. Це пояснюється, насамперед, «ігноруванням» лімітуючої (фосфотріозкіназної) реакції катаболізму глюкози. Подальший метаболізм надлишкового ацетил-SКоА в даному випадку може призвести до надмірного утворення вищих жирних кислот і триацилгліцеролів або виникнення діабетичного кетоацидозу.

Схема ферментативних реакцій перетворення фруктози в глюкозу та залучення її на шлях гліколізу/глюконеогенезу представлена нижче:



Спадкові ензимопатії метаболізму фруктози – патології пов'язані з генетичними дефектами синтезу певних ферментів метаболізму фруктози. До них належать:

1) доброякісна есенціальна фруктозурія – патологія обміну фруктози, спричинена недостатністю фруктокінази. Ензимопатія характеризується порушенням клітинної утилізації фруктози та появою її в сечі без суттєвих клінічних проявів

2) спадкова непереносимість фруктози (мальабсорбція фруктози, фруктоземія) – патологія, зумовлена вродженим дефіцитом ферменту фруктозо-1-фосфат-альдолази (альдолази В). Це аутосомно-рецесивне захворювання, викликане мутацією ALDOB-гена, розташованого в локусі q22.3 IX хромосоми. Ферментативний дефект спричиняє накопичення в тканинах фруктозо-1-фосфату, який є інгібітором деяких ферментів вуглеводного обміну, зокрема фосфорилази глікогену. Патологія зазвичай виявляється у малюків після введення прикорму та проявляється фруктоземією, фруктозурією і вираженою гіпоглікемією, які розвиваються після споживання продуктів, що містять фруктозу, а також компенсаторним посиленням ліполізу з небезпекою розвитку метаболічного ацидозу.

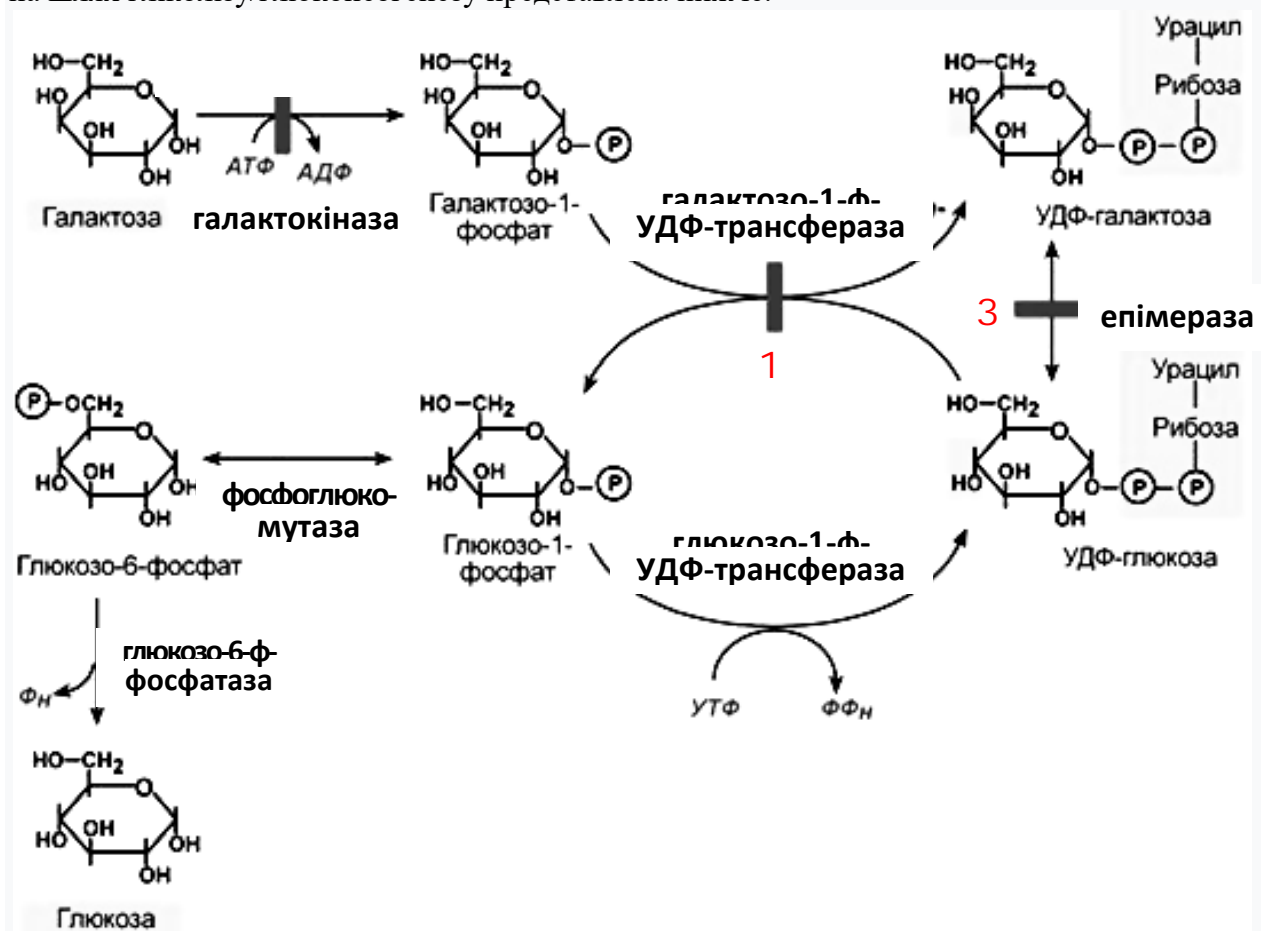
Крім того є окремі повідомлення, що до аналогічних порушень метаболізму можуть призвести також зниження активності фруктозо-1,6-дифосфатази (на схемі – 3) та фруктозо-1,6-дифосфат-альдолази (альдолази А).

Метаболізм галактози.

Основним джерелом галактози в організмі людини є її надходження з продуктами харчування. Вона входить до складу дисахариду лактози, яка гідролізується в кишечнику ферментом ентероцитів лактазою до двох гексоз (глюкози і галактози). Окрім цього, певна її кількість може синтезуватись в організмі з глюкози (реакцією епімеризації – дивись нижче).

Галактоза включається в метаболізм складнішим порівняно з фруктозою шляхом. Спочатку специфічна галактокіназа каталізує фосфорилювання галактози за допомогою АТФ з утворенням галактозо-1-фосфату. Відомо, що галактокіназа печінки плода і дітей раннього віку характеризується активністю, приблизно в 5 разів вищою, ніж у дорослих. В наступній реакції фермент печінки галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза каталізує утворення УДФ-галактози в реакції обміну між галактозо-1-фосфатом і УДФ-глюкозою (УДФ-глюкоза – це активна форма глюкози, яка використовується також для синтезу глікогену). Утворена УДФ-галактоза в клітинах використовується як донор галактози в реакціях синтезу багатьох сполук: лактози (в молочній залозі), глікозаміногліканів, протеогліканів, глі-копротеїнів і гліколіпідів. Крім того, можливе подальше ферментативне перетворення залишку галактози в УДФ-галактозі – під дією УДФ-галактозо-4-епімерази (реакція епімеризації біля IV атому вуглецю) вона перетворюється на залишок глюкози (кофермент в реакції – НАД). УДФ-глюкоза може знову взаємодіяти з галактозо-1-фосфатом, перетворюючись на глюкозо-1-фосфат, чи використовуватись на синтез глікогену.

Схема ферментативних реакцій перетворення галактози в глюкозу та залучення її на шлях гліколізу/глюконеогенезу представлена нижче.



Спадкові ензимопатії метаболізму галактози – патології пов'язані з генетичними дефектами синтезу певних ферментів її метаболізму.

Найбільше клінічне значення має спадковий дефект синтезу ферменту галактозо-1-фосфат-УДФ-трансферази, який проявляється класичною маніфестною формою галактоземії (на схемі – 1). Внаслідок неспроможності біохімічних систем організму перетворювати галактозу на глюкозу в крові та внутрішніх органах хворих нагромаджується галактоза, галактозо-1-фосфат та продукти їх побічних перетворень (насамперед, галактіол або дульцит), які призводять до досить різких порушень загального метаболізму.

Захворювання проявляється в перші ж дні після народження, як тільки дитина починає отримувати молоко. Ранні симптоми захворювання неспецифічні: часті відрижки,

погана прибавка маси тіла, дегідратація, діарея, жовтяниця. Потім приєднуються ознаки ураження печінки (гепатоспленомегалія), порушення функцій нирок, помутніння кристалика, затримка розумового розвитку, підвищення рівня печінкових ферментів, гіпербілірубінемія, гіпоальбумінемія, ацидоз, порушення згортання крові, асцит. Нерідко зустрічається гіпоглікемія. Частою причиною смерті є гострий сепсис, викликаний *E.coli*.

Хвороба має аутосомно-рецесивний тип успадкування з множинними алелями. Частота серед живонароджених коливається 1:2000–60000. Важкі форми закінчуються летально в перші тижні життя, при затяжному перебігу на перший план виступають явища хронічної недостатності печінки та/або ураження центральної нервової системи.

Лабораторні дослідження виявляють гіпергалактоземію, галактозурію, протейнурію, патологічну криву при навантаженні галактозою, зниження активності галактозо-1-фосфатуридилтрансферази в еритроцитах.

Насьогодні на галактоземію проводиться масове обстеження новонароджених. Спочатку визначається рівень загальної галактози в плямах висушеної крові флуоресцентним методом. При виявленні підвищеного рівня галактози для уточнення діагнозу визначається рівень активності галактозо-1-фосфат-УДФ-трансферази.

Дуже рідко зустрічаються дефекти двох інших ферментів – галактокінази і уридилфосфат-4-епімерази (на схемі відповідно – **2** та **3**). Вони проявляються галактоземією, галактозурією, катарактою (не завжди), проте важкі клінічні прояви при цьому відсутні.

Галактоземію не слід плутати з непереносимістю лактози (порушенням розщеплення цього дисахариду в ШКТ внаслідок недостатності лактази).

Обмін глікогену

Гомополісахарид глікоген («тваринний крохмаль») – це основна форма зберігання глюкози в клітинах тварин, більшості грибів, багатьох бактерій та архей. Головними місцями накопичення глікогену в людському організмі є печінка та скелетні м'язи. Здатність печінки підвищувати концентрацію глюкози в крові за рахунок наявності в ній крохмале-подібної речовини, яку було названо глікогеном, була відкрита Клодом Бернаром (1875).

Запасання глюкози не у вільній формі, а у вигляді полісахаридів диктується двома причинами. По-перше, якби, наприклад, в гепатоциті вся глюкоза, що входить до складу глікогену, перебувала у вільному стані, її концентрація сягнула б 400 ммоль/л. Це призвело б до значного підвищення осмотичного тиску цитозолу, надмірного надходження води в клітину і її розривання. По-друге, така висока концентрація глюкози зробила б фактично неможливим її активний транспорт в клітини. Зберігання ж глюкози у формі глікогену дозволяє знизити її концентрацію в клітині до 0,01 мкмоль/л.

Глікоген є гомополімером α -D-глюкопіранози, залишки якої з'єднані між собою ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-глікозидними зв'язками в лінійні ланцюги. Через кожні 8-10 лінійно розташованих мономерних залишків є відгалуження (бічні гілки приєднані ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-зв'язками), тобто молекула глікогену значно більш розгалужена і компактна, ніж крохмалю. Коли відбувається гідроліз глікогену для використання його як джерела енергії, залишки глюкози по одному відщеплюються від нередукуючих кінців (всі розгалуження глікогену мають нередукуючі кінці). Їх велика кількість дозволяє суттєво прискорити процес появи вільної глюкози.

Порушення обміну глікогену, обумовлене дефектами відповідних ферментів, призводить до розвитку глікогенозів різних типів.

I тип (хвороба Гірке) викликаний відсутністю активності ферменту глюкозо-6-фосфатази в печінці і слизовій кишківника. Успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Порушується одна з головних функцій печінки – підтримання гомеостазу глюкози крові – і порушується процес утворення глюкози з амінокислот. Водночас у гепатоцитах знаходять багато ліпідів. Клінічна картина дуже типова для печінкової форми глікогенової хвороби. Особливістю є те, що у дітей 5-7 років бувають геморагічні висипання і кровотечі, пов'язані з порушенням функції тромбоцитів. Іншою особливістю є підвищення в крові

сечової кислоти, симптомокомплекс подагри розвивається в більш пізньому віці. Часто відзначається збільшення нирок. Діагностувати захворювання можна за допомогою введення мічених атомів глюкози. Остаточний діагноз ставлять за результатами біопсії печінки: наявність у клітинах великої кількості нормального за структурою глікогену, що є специфічною ознакою цього захворювання. Хворим рекомендують уникати вживання продуктів, які містять сахарозу і лактозу.

II тип (хвороба Помпе) – хвороба має найбільш несприятливий перебіг, при цьому в усіх органах відсутні лізосомальна альфа-глюкозидаза і гама-амілаза, що призводить до накопичення глікогену в усіх тканинах і насамперед інтенсивно працюючих м'язах (серце). Хвороба з'являється на першому році життя у вигляді симптомокомплексу серцевої недостатності. Відзначається збільшення серця, печінки, гіпертрофія м'язів, збільшення язика. Дигина часто збуджена, але її спонтанні рухи поступово стають обмеженими, сухожилкові рефлексії до 4-5-місячного віку зникають. Прогноз несприятливий – дитина гине до кінця I року життя. При патологоанатомічному дослідженні зміни виявляють в усіх органах і тканинах. Генетично захворювання вважається аутосомно-рецесивним. Частіше хворіють хлопчики. Ефективного лікування не існує. Можлива пренатальна діагностика цього захворювання методом амніоцентезу (дослідження клітин шкіри плоду).

III тип (хвороба Корі) викликаний відсутністю або зниженням активності аміло-1,6-глюкозидази. При ньому страждають печінка, серце і скелетні м'язи. Клінічна картина відноситься до печінкової форми захворювання і подібна до такої при I типі глікогенозу. Прогноз, як правило, сприятливий. Захворювання найбільш небезпечне в 4-5 років, коли часті напади гіпоглікемії. В більш зрілому віці симптоми захворювання згладжуються. Лікування дає хороші результати при застосуванні багатой на білки дієти з частими прийомами їжі, щоб утворення глюкози йшло обхідним шляхом за допомогою трансамінування амінокислот.

IV тип (хвороба Андерсена) спричинений відсутністю ферменту амілотранс-глюкозидази. Замість глікогену в уражених органах синтезується полісахарид, подібний до амілопектину. Хвороба з'являється з першого року життя і подібна за клінікою до цирозу печінки. Фермент відсутній в печінці, нирках, селезінці, серцевому і кістковому м'язах. Смерть настає на першому році життя.

V тип (хвороба Мак-Ардія) характеризується дефіцитом фосфорилази тільки в м'язах. Захворювання успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Клініка типова для м'язової форми глікогенозу.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Метаболізм фруктози в організмі людини та його порушення. Лабораторна діагностика.
2. Метаболізм галактози в організмі людини та його порушення. Лабораторна діагностика.
3. Будова і біологічна роль глікогену.
4. Біосинтез глікогену: хімізм, ключові ферменти, фізіологічне значення.
5. Фосфоролітичний шлях розпаду глікогену в печінці і м'язах.
6. Роль адреналіну, глюкагону і інсуліну в регуляції метаболізму глікогену в м'язах і печінці. Механізми ц-АМФ-залежної регуляції активностей глікогенфосфорилази і глікогенсинтетази.
7. Механізми реципрокної регуляції глікогенолізу і глікогенезу
8. Генетичні порушення дії ферментів метаболізму глікогену (глікогенози, аглікогенози).

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол №3

Дата

1. Визначення активності α -амілази у сироватці крові та сечі методом Каравея

Принцип методу: В присутності α -амілази крохмаль гідролізується до похідних, що не дають кольорової реакції з йодом. Зміна інтенсивності фарбування йод-крохмального комплексу пропорційна активності ферменту в пробі.

Лінійність методу: 3,0–36,0 мг/сек*л

Нормальні значення: сироватка/плазма – 3,3–8,9 мг/сек*л (12–32 мг/год*мл)
сеча – до 44 мг/сек*л (до 120 мг/год*мл)
дуоденальний вміст – 1,7–4,4 г/сек*л (6–16 г/год*мл)

Активність ферменту стабільна протягом 5 год. при температурі +2 - +8⁰ С, якщо сироватка/плазма відібрані не пізніше 30 хв. після забору крові.

Обладнання і реagenти:

- 1) ФЕК: довжина хвилі – 640 нм; довжина оптичного шляху – 10 мм
- 2) Водяний термостат (автоматична водяна баня) з температурою (37 ± 1)⁰С.
- 3) Мірна колба місткістю 1000 мл; автоматичні чи скляні піпетки (0,1 і 5 мл)
- 4) Сироватка крові
- 5) Субстратно-буферний розчин
- 6) Розчин йоду 0,1 н
- 7) Розчин інгібітору

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти в пробірку, мл:	Дослідна проба	Холоста проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	1,0	1,0	1,0
Інкубувати 3 хв при +37 ⁰ С			
Сироватка крові	0,02	-	-
Інкубувати 7,5 хв при +37 ⁰ С			
Розчин йоду 0,1 н	1,0	1,0	-
Сироватка крові	-	0,02	-
Вода дистильована	8,0	8,0	9,0

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 5 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної ($E_{\text{дос}}$) та калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) проти холостої при довжині хвилі 640 – 670 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Розрахунок активності фермента в сироватці крові проводять за формулою

$$C_{\text{дос}} = \frac{E_{\text{к}} - E_{\text{д}}}{E_{\text{к}}} \times 160 \text{ (г/год*л)}$$

де $C_{\text{дос}}$ – активність амілази у дослідному зразку;

$E_{\text{д}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{к}}$ – оптична щільність контрольної проби;

160 – фактор перерахування, г/год*л

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Е досл.	Абсолютне значення

Висновок:

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім описаного визначення амілази за допомогою ФЕК, паралельно виконується її визначення на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. У дитини відзначається блювота і пронос після прийому їжі, загальна дистрофія, гепато- і спленомегалія. Після припинення годування молоком симптоми зменшуються. Укажіть можливе порушення обміну речовин:

- A. Гіперсекреція залоз внутрішньої секреції
- B. Порушення обміну фенілаланіну
- C. Порушення обміну галактози
- D. Порушення обміну тирозину
- E. Недостатність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази

2. У дитини першого року життя виявлене збільшення печінки, нирок, затримка росту, судоми (як наслідок гіпоглікемії). Подальше дослідження показало відсутність ферменту глюкозо-6-фосфатази. Виберіть тип глікогенозу, пов'язаний зі спадковим дефектом синтезу даного ферменту:

- A. Хвороба Гірке
- B. Хвороба Помпе
- C. Хвороба Андерсена
- D. Хвороба Мак-Ардла
- E. Хвороба Томсона

3. При хронічному передозуванні глюкокортикоїдів у хворого виникає гіперглікемія. Назвіть процес вуглеводного обміну, за рахунок якого збільшується концентрація глюкози:

- A. Глюконеогенез
- B. Глікогеноліз
- C. Глікогенез
- D. Аеробний гліколіз
- E. Пентозофосфатний цикл

4. При лабораторному обстеженні в хворого виявлено надмірне накопичення глікогену в печінці. Укажіть назву хвороби, при якій це спостерігається:

- A. Хвороба Гірке
- B. Хвороба Адисона
- C. Хвороба "кленового сиропу"
- D. Хвороба Дауна
- E. Хвороба Боткіна

5. Укажіть фермент, спадкова відсутність якого є причиною фруктоземії:

- A. Фруктокіназа
- B. Фосфофруктокіназа
- C. Гексокіназа
- D. Глюкокіназа
- E. Піруваткіназа

6. Концентрацію якої речовини слід визначати у плазмі крові хворого глікогенозом I типу:

- A. Глюкози
- B. Фруктози
- C. Галактози
- D. Аланіну
- E. Сечової кислоти

7. При дослідженні крові у хворого виявлено виражену гіпоглюкоземію натще. При дослідженні біоптату печінки виявилось, що в клітинах печінки не відбувається синтез глікогену. Нестача якого ферменту є причиною захворювання?

- A. Альдолази
- B. Фруктозодифосфатази
- C. Глікогенсинтази
- D. Фосфорилази
- E. Піруваткарбоксилази

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ №4

1. ТЕМА: Метаболізм глікопротеїнів, протеогліканів, глікозаміногліканів. Лабораторна діагностика порушень метаболізму.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Вуглеводи разом з іншими речовинами відносяться до основних компонентів клітин. Частка вуглеводів в тканинах в порівнянні, наприклад, з білками, незначна, проте їх фізіологічна роль велика, що зумовлено різноманітними функціями вуглеводів (енергетична, пластична, захисна і ін.). Про порушення обміну досить

об'єктивно свідчать зміни концентрації вуглеводів (глюкоза, глікоген) та їх метаболітів, а також зміни активності ферментів вуглеводного обміну в біосубстратах при різних захворюваннях, що широко застосовується в якості діагностичних показників.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Вивчити основні питання заняття щодо специфіки обміну складних вуглеводів та його регуляцію в умовах норми і патології. Вміти пов'язувати знання теоретичного матеріалу з конкретними результатами лабораторного практикума і тестів вуглеводного обміну як продіагностичних показників.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Сполучні тканини, на відміну від всіх інших тканин характеризуються значно меншим співвідношенням загальної кількості клітин до вмісту міжклітинної речовини.

Міжклітинна речовина сполучної тканини має дуже складний хімічний склад. До міжклітинного матриксу входять три основних класи білкових молекул: **фібрилярні білки** двох функціональних типів – переважно **структурні** (сімейства колагену і еластину) та переважно **адгезивні** (сімейства фібронектину або ламініну), а також **протеоглікани**. Всі зазначені білки відносяться до групи білково-вуглеводних комплексів.

Білково-вуглеводні комплекси позаклітинного матриксу

Білково-вуглеводні комплекси класифікуються за двома критеріями: за кількістю (долею) вуглеводів в комплексі та за якісним моносахаридним складом. Серед них виділяють **протеоглікани** (понад 95% вуглеводів), **мукопротеїни** (10-50% вуглеводів) та **глікопротеїни** (менше 10% вуглеводів).

Протеоглікани – це білкові комплекси, в яких з молекулами білка ковалентно зв'язані **глікозаміноглікани**. Білки протеогліканів називають коровими білками (**core** – серцевина, стрижень).

Глікозаміноглікани – це гетерополісахариди, побудовані за стандартним принципом. Вони складаються з великої кількості сполучених $\beta(1-4)$ глікозидними зв'язками **дисахаридів**, що повторюються, мономери яких – **уронові кислоти** та **гексозаміни** – зв'язані між собою переважно $\beta(1-3)$ або $\beta(1-4)$ глікозидним зв'язком.

Для більшості глікозаміногліканів характерні наступні ознаки:

- структурно є довгими лінійними полісахаридними ланцюгами
- мономерами їх полісахаридних ланцюгів є різні гетеродисахариди
- в складі їх структурних гетеродисахаридів один з двох залишків – це аміноцукор: N-ацетилглюкозамін або -галактозамін, який в більшості глікозаміногліканів сульфатується; другий цукор, як правило, уронова кислота (глюкуронова або ідуоронова)
- полісахаридні ланцюги ковалентно зв'язані з коровими білками

Глікозаміноглікани класифікують за залишками моносахаридів, які утворюють їх структурні дисахаридні мономери, за типами зв'язків між ними, за локалізацією сульфатних груп та ін.

Полісахаридні ланцюги глікозаміногліканів – рухомі структури. На відміну від білків вони не можуть утворювати компактні глобули. Структурна та хімічна організація глікозаміногліканів зумовлює їх здатність утворювати впорядковані мережі з мікропорами певної величини, що забезпечують селективну проникність для різних речовин (молекулярне сито) та є механічним бар'єром для бактерій. Саме в цьому полягає їх захисна роль. Глікозаміноглікани зв'язують величезну кількість води (до 500 молекул на одну макромолекулу). Порушення цієї властивості може привести до обезводнення або, навпаки, до надмірного накопичення води (наприклад, при мікседемі). Завдяки високій гідро-фільності та свободі вибору конформації, глікозаміноглікани займають великі об'єми, утворюючи гелі при досить низьких концентраціях самого полісахариду. Цим

зумовлений тургор тканин, який дозволяє протистояти компресійним силам. Наприклад, суглобовий хрящ може витримати тиск в сотні атмосфер.

Гіалуронат (гіалуронова кислота або гіалуронан) – найбільш простий глікоз-аміногліканів. Його структурним дисахаридом, що повторюються до 250000, є сполучені $\beta(1-3)$ глікозидним зв'язком D-глюкуронат та глюкоз-N-ацетиламін. Він виявлений в усіх тканинах на всіх стадіях розвитку тварин. Це найбільш рання еволюційна форма глікоз-аміногліканів і, можливо, тому є не зовсім типовим за будовою. Гіалуронова кислота – це єдиний глікозаміноглікан, який не містить в своєму складі сульфатів; вона може синтезуватися прямо на поверхні комплексами ферментів, занурених в плазматичну мембрану. Вона не завжди з'єднується з білками, а якщо і з'єднується, то цей зв'язок нековалентний. Гіалуронат синтезується на базальній стороні епітеліального шару і часто служить для створення вільного позаклітинного простору, по якому під час морфогенезу і загоєння ран мігрують фібробласти та інші клітини. Саме її густа мережа з мікропорами і є бар'єром для бактерій (крім тих, що виділяють фермент гіалуронідазу).

На відміну від гіалуронату всі інші глікозаміноглікани містять сульфати і є відносно невеликими молекулами.

Хондроїтин-4 (чи 6)-сульфати. Протеоглікани, що містять хондроїтин-сульфати, з O-глікозидним зв'язком, виявлені в хрящі. Кожен ланцюг містить до 40 дисахаридних одиниць (D-глюкуронат + Галактоз-N-ацетил-4- або -6-сульфат, сполучені $\beta(1-3)$ глікозидним зв'язком) з молекулярною масою 20000-50000. Хондроїтин-сульфати локалізуються також в місцях кальцифікації ендохондральних кісток. Крім цього, протеоглікан, що містить хондроїтин-сульфати, виявлений в деяких нейронах, де виконує роль ендоскелету, підтримуючи форму нейрона.

Дерматан-сульфат. Широко поширений в тваринних тканинах. Структурно подібний хондроїтин- і гепаран-сульфатам. На відміну від хондроїтин-сульфату замість глюкуронової кислоти містить ідурунову кислоту. Дерматан-сульфат склери додає їй міцність, що забезпечує підтримку форми очного яблука.

Кератансульфати I і II. Вони побудовані з дисахаридів, котрі включають галактозу і N-ацетилглюкозамін, сполучених $\beta(1-4)$ глікозидним зв'язком. Галактоза і глюкоз-амін в складі цих дисахаридів сульфатуються. Кератан-сульфати відрізняються типом зв'язку з білком. Кератансульфат I і дерматансульфат присутні в рогівці. Вони розташовуються між колагеновими волокнами та відіграють важливу роль в прозорості рогівки.

Гепарин. Складається з глюкозаміну та двох типів уронових кислот: глюкуронової та ідурунової, сполучених, на відміну від усіх інших глікозаміногліканів, $\alpha(1-4)$ глікозидним зв'язком. Більша частина аміногруп глюкозаміну сульфатована, а менша – ацетильована. Ідурунова кислота утворюється з глюкуронової вже після збірки молекули гепарину за участю спеціальних ферментів (епімераз). У тканинах входить до складу протео-гліканів, білкові частини яких містять багато серину і гліцину. Гепарин є важливим антикоагулянтом. Він зв'язується з гемостатичними факторами IX і XI, але найбільш важливою є його взаємодія з антитромбіном III. Зв'язуючись з ним в співвідношенні 1:1, гепарин різко підсилює інгібуючу дію антитромбіну. Це пов'язано з тим, що гепарин змінює конформацію білка, підсилюючи взаємодію з сериновими пептидазами. Гепарин відомий також як сполука, здатна специфічно зв'язуватися з ліпопротеїноліпазою на стінках капілярів, призводячи до виходу ферменту в кровотік і підсилюючи катаболізм хіломікронів.

Гепаран-сульфат. Зустрічається переважно на клітинній поверхні. На відміну від гепарину в ньому переважає мало сульфатований глюкозамін і глюкуронова кислота.

Глікозаміноглікани характеризуються інтенсивним метаболізмом. Так наприклад, період напівжиття гіалуронової кислоти складає 2-4 дні. Деградація глікозаміногліканів здійснюється головним чином лізосомальними ферментами (екзо- та ендоглікозидазами, сульфогідролазами і ін.).

Патологія глікозаміногліканів полягає в порушенні їх синтезу, розпаду або того й іншого процесів одночасно. Найбільш детально досліджено ряд патологічних станів, які об'єднані під назвою **мукополісахаридози** (хвороби накопичення глікозаміногліканів). Їх причина – це дефіцит ферментів, необхідних для деградації зазначених олігосахаридів. Як правило, цей дефіцит носить спадковий характер. Причому, в переважній більшості випадків блок на певному етапі розпаду глікозаміногліканів перешкоджає дії наступного по черзі ферменту, тому найхарактернішим для таких захворювань є накопичення в лізосомах клітин негідролізованих субстратів блокованої ферментативної реакції (часто разом з попередниками) і в той же час збільшене виділення їх з екскретами.

Комплексна біохімічна діагностика мукополісахаридозів включає кількісне визначення глікозаміногліканів, що екскретуються (за вмістом уронових кислот та гексоз), електрофоретичне фракціонування їх (по можливості з денситометрією) та визначення активності ферментів деградації глікозаміногліканів. Вказані дослідження дозволяють провести диференційну діагностику мукополісахаридозів з клінічно подібними патологічними станами (глікопротеїнозами, муколіпідозами, артрогрипозом, гіпотиреозом, спондило-епіфізарними дисплазіями та ін.), а також віднести хворих до відповідної фенотипічної групи (за видом продукту накопичення).

Мукополісахаридози диференціюють на декілька нозологічних одиниць (хвороб або синдромів), наведених в таблиці.

Синдром	Дефект ферменту	Продукт накопичення
Гурлера	α -L-ідуронідаза	дерматан- і гепаран-сульфати
Хантера	сульфоідуронат-сульфатаза	дерматан- і гепаран-сульфати
Санфіліппо	A. гепаран-N-сульфатаза B. α -N-ацетилглюкозамінідаза C. α -глюкозамін-ацетил-трансфераза * D. N-ацетилглюкозамін-6-сульфатаза	гепаран-сульфати
Моркіо	A. N-ацетилгалактозамін-6-сульфатаза B. β -галактозидаза	кератан- і хондроїтин-6-сульфати
Шейє**	α -L-ідуронідаза	дерматан-сульфати
Марото-Ламі	N-ацетилгалактозамін-4-сульфатаза	дерматан-сульфати
Слая	β -D-глюкуронідаза	хондроїтин-сульфати

* фермент бере участь не в розпаді, а в синтезі(!) гепаран-сульфату

** насьогодні вважається більш м'яким варіантом типу I (маніфестується пізніше та повільніше); описана також проміжна клінічна форма – синдром Гурлера-Шейє

Всі вказані хвороби успадковуються по аутосомно-рецесивному типу, за винятком синдрому Хантера (рецесивний, зчеплений з X-хромосомою).

Ураження сполучної тканини при різних варіантах мукополісахаридозів суттєво відрізняються за ступенем вираженості симптомів та органом локалізацією.

Тип мукополісахаридозу	Характерні симптоми
Гурлера	Розумова відсталість, рання катаракта, важкі порушення скелету, гарголізм, вісцеромегалія
Хантера	Розумова відсталість, дизостоз, карликовість, гепатоспленомегалія, кардіопатії
Санфіліппо	Розумова відсталість, помірні порушення скелету, вісцеромегалія,

	катаракта
Моркіо	Інтелект в нормі, катаракта, важкі порушення скелету, аортальна недостатність
Шейє	Інтелект в нормі, катаракта, незначні порушення скелету
Марото-Ламі	Інтелект в нормі, катаракта, важкі порушення скелету, гарголізм
Спая	Розумова відсталість, дизостоз, гепатоспленомегалія

Протеоглікани побудовані з різних за розміром та структурою ланцюгів глікозаміногліканів, ковалентно зв'язаних з коровими білками. Виділяють три типи зв'язку між глікозаміногліканами та коровими білками:

- О-глікозидний зв'язок між ксилулозою та серином. Цей зв'язок характерний для більшості протеогліканів. Він утворюється при пострібосомальному процесингу зазначених білків шляхом перенесення ксилулози на серин корового білка. Субстратом для такого перенесення служить УДФ-ксилулоза. Потім до ксилулози додаються два залишки галактози, утворюючи зв'язуючий трисахарид. Ланцюг глікозаміноглікану росте шляхом поступового нарощування вказаного трисахариду.
- О-глікозидний зв'язок між N-ацетил-галактозаміном і серином (треоніном), характерний для кератан-сульфату. Донором галактозаміну є УДФ-N-ацетилгалактозамін.
- N-глікозиламіний зв'язок між N-ацетил-глюкоз(галактоз)-аміном і амідним азотом аспарагіну.

Будучи структурними компонентами позаклітинного матриксу, протеоглікани специфічно взаємодіють колагеном, еластином, фібронектином, ламініном та іншими білками; забезпечують міжклітинну взаємодію, беручи участь у формуванні рецепторів на поверхні мембран; входять до складу синаптичних та інших везикул; впливають на клітинну міграцію; забезпечують тургор різних тканин; зв'язують полікатиони та катіони; регулюють фільтрацію в клубочках нирок; протистоять компресійним силам в хрящовій тканині; підтримують прозорість рогівки; виконують структурну роль в склері; діють як антикоагулянти.

Глікопротеїни і мукопротеїни – це два класи білково-вуглеводних комплексів, які можна об'єднати в один. Відмінності між ними стосуються лише кількості вуглеводів, ковалентно приєднаних до білків: у глікопротеїнів вуглеводи складають до 10%, а у мукопротеїнів – до 50% від маси молекули. Моносахариди гліко- та мукопротеїнів представляють собою більш різноманітну групу, порівняно з глікозаміногліканами. Крім глюкози, галактози та їх амінів в складі олігосахаридних компонентів цих складних білків виявлено фукозу, маннозу, N-ацетилнейрамінову кислоту і ін. Субстратами, які приймають участь в синтезі гліко- та мукопротеїнів, є активні форми зазначених моносахаридів та їх похідних: УДФ-галактоза(глюкоза), УДФ-ацетил-галактоз(глюкоз)-аміни, ГДФ-ман-ноза і ГДФ-фукоза, ГМФ-нейрамінова кислота.

Гліко- та мукопротеїни виконують різноманітні функції: вони є структурними компонентами клітинних мембран, фібрилярних волокон, кістково-го матриксу; виконують роль змащувального матеріалу, обумовлюючи зменшення тертя дотичних поверхонь (муцини); є транспортними молекулами для вітамінів, ліпідів, мікроелементів; виконують роль сполучного елемента в міжклітинній взаємодії. Глікопротеїнами є імуноглобуліни, антигени гістосумісності, комплемент, інтерферон та деякі гормони (ТТГ, хоріонічний гонадотропін) і ферменти (гідролази, нуклеази, глікозидази, чинники системи гемостазу).

Тип зв'язку між білком і вуглеводом в білково-вуглеводних комплексах є результатом різних механізмів синтезу. Поліпептидні ланцюги (корові білки) обох типів білково-вуглеводних комплексів синтезуються на мембранозв'язаних полірибосомах. Вуглеводна ж їх частина утворюється двома різними способами.

Олігосахаридні ланцюги О-зв'язаних комплексів синтезуються шляхом поступового приєднання моносахаридів до утвореного поліпептидного ланцюга. Цей

процес каталізують мембранозв'язані глікозилтрансферази. Утворення кожного типу зв'язку забезпечує окремий специфічний фермент. Приєднання першого цукру відбувається під час трансляції, а інші додаються ферментами, локалізованими на ендоплазматичній мережі. Ферменти, що приєднують останній цукор, локалізовані в апараті Гольджі.

Синтез олігосахаридної частини N-зв'язаних комплексів відбувається окремо від білкової компоненти. Провідну роль в цьому відіграє доліхол (сполука з 17-20 одиниць ізопренів), на якому проходить утворення вуглеводного ланцюга. Синтезований олігосахарид переноситься на амідний азот аспарагіну корового білка. Причому аспарагін входить до складу характерного три пептиду – **аспарагін-Х-серин** (чи треонін), де Х – будь-яка амінокислота окрім проліну та аспартату. Каталізує процес переносу єдиний мембранозв'язаний фермент – олігосахарид-трансфераза.

Порушення синтезу білково-вуглеводних комплексів призводить до важких системних захворювань.

Розпад білково-вуглеводних комплексів відбувається за участю відповідних лізосомальних гідролаз – α -нейрамідіази, β -галактозидази, β -гексоз-амідіази, α - і β -маннозидаз, α -фукозидази, ендо- β -N-ацетилглюкозамідіази, аспартилглюкозамідіази та ін. Генетично детермінований дефект вказаних ферментів веде до порушення розпаду певних білково-вуглеводних комплексів та розвитку одного з відповідних глікопротеїнозів: сіалидози, маннозидози, фукозидози, аспартилглюкозамінурія. Ці захворювання мають різноманітні клінічні прояви, іноді їх відносять до муколіпідозів. Їх діагностика заснована на дослідженні активності зазначених ферментів (найчастіше в лейкоцитах). В ряді випадків можлива пренатальна діагностика шляхом аналізу відповідних ферментів в амніотичній рідині і крові матері.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Загальні уявлення про метаболізм глікозаміногліканів.
2. Генетичні порушення метаболізму глікозаміногліканів.
3. Методи дослідження вуглеводмісних білків та їх компонентів у крові
4. Клініко-діагностичне значення визначення сероглікоїдів та фракцій глікопротеїдів у сироватці крові
5. Окремі представники фракцій глікопротеїдів та методи їх дослідження (гаптоглобін, фруктозамін, глікозований гемоглобін, церулоплазмін)

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 4

Дата

1. Визначення сіромукоїдів (сіроглікоїдів) у сироватці крові турбідиметричним методом

Принцип методу:

При додаванні до сироватки крові розчину хлорної кислоти частина білкових речовин випадає в осад, а сіромукоїди залишаються у розчині, з якого осаджуються фосфорновольфрамвою кислотою. За ступенем помутніння реакційного розчину роблять висновок про вміст сіромукоїдів у сироватці. Концентрація сіромукоїдів стабільна 2 доби при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$, (якщо сироватка(плазма) відібрані не пізніше 30 хв. після забору крові!).

Лінійність методу: 0–15 од. S-N (за Shank і Hoagland)

Нормальні значення: сироватка, плазма – 3–5 од. S-N чи 0,13–0,18 оптичних одиниць

Обладнання і реанти:

- 1) ФЕК: довжина хвилі (630 - 690) нм; довжина оптичного шляху 10 мм
- 2) Скляні піпетки на 1 і 5 мл; колби мірні місткістю 50; 100 та 250 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) Розчин хлорної кислоти
- 6) Розчин фосфорновольфрамної кислоти

Приготування робочих розчинів:

Робочий розчин хлорної кислоти (1,8±0,1) моль/л. Вміст флакону з хлорною кислотою (3,6±0,2) моль/л кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять до мітки дистильованою водою і перемішують. Розчин стабільний при температурі від 0°C до +8°C до закінчення гарантійного терміну придатності.

Розчин фосфорновольфрамної кислоти – готовий до роботи, стабільний при t від +2°C до +16°C до закінчення терміну придатності.

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти у пробірку:	Дослідна проба	Холоста проба
Сироватка крові	0,5 мл	--
Фізіологічний розчин	4,5 мл	5,0 мл
Робочий розчин хлорної кислоти	2,5 мл	2,5 мл
Змішують розчини (розчин хлорної кислоти додають краплями), перемішують інтенсивним струшуванням або за допомогою скляної палички, витримують 10 хв при кімнатній температурі і центрифугують 20 хв при 2000–2500 об/хв .		
Центрифугат	5,0 мл	5,0 мл
Фосфорновольфрамна кислота	1,0 мл	1,0 мл

Перемішати вміст пробірок та інкубувати протягом 15 хв. Виміряти оптичну щільність дослідної проби проти холостої (довжина хвилі 670 нм).

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Е досл.	Абсолютне значення

Висновок:

Клініко-діагностичне значення.

Загальний вміст сіромукоїдів збільшується при запальних і некробіотичних процесах, у тому числі при жовтяничному синдромі, злоякісних пухлинах, загостренні хронічного холециститу, деструктивній формі туберкульозу легенів,

ревматизмі, інфаркті міокарда, мозковому інсульті. Рівень сіромукоїдів знижується при порушенні протеосинтетичної функції печінки – інфекційному гепатиті, гепатоцелюлярній дистрофії, розсіяному склерозі, гепатоцеребральній дистрофії.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім описаного визначення сіромукоїдів за допомогою ФЕК, паралельно виконується визначення діагностичних маркерів порушень обміну ГАГ на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. У літньої жінки розвилася катаракта на тлі цукрового діабету. Назвіть процес, стимуляція якого є причиною змутнення кришталика:

- A. Глікозилювання білків
- B. Протеоліз білків
- C. Кетогенез
- D. Ліполіз
- E. Глюконеогенез

2. Мукополісахаридоз відноситься до хвороб накопичення. Через відсутність ферментів порушується розщеплення полісахаридів. У хворих спостерігається посилення виділення їх з сечею та накопичення в одному з органів клітини. У яких органах накопичуються мукополісахариди?

- A. У лізосомах
- B. В комплексі Гольджі
- C. В клітинному центрі
- D. В ендоплазматичному ретикулумі
- E. У мітохондріях

3. У дитини спостерігається затримка фізичного та розумового розвитку, глибокі порушення з боку сполучної тканини внутрішніх органів, в сечі виявлено кератансульфати. Обмін яких речовин порушений?

- A. Еластин
- B. Колаген
- D. Гіалуронова кислота
- E. Глікозаміноглікани

8. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 5

1. ТЕМА: Обмін вищих жирних кислот та кетонових тіл. Кетонемія, кетонурія.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ: Вищі жирні кислоти є субстратом для синтезу структурних компонентів біологічних мембран, а також виконують роль енергетичного депо. Порушення обміну ВЖК викликає такі патології, як ожиріння та кетоацидоз при цукровому діабеті.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичні положення обміну ВЖК та шляхи його регуляції. Вміти визначати вміст кетонів у сироватці крові.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

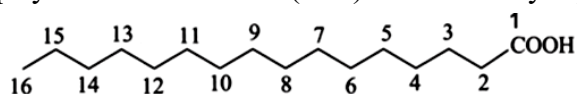
Вищі жирні кислоти – це основні гідрофобні компоненти простих та складних ліпідів. Вони є довголанцюговими органічними молекулами, що містять полярну карбоксильну групу і довгий неполярний вуглеводневий «хвіст». ВЖК – обов'язкові структурні компоненти будь-якого омилюваного ліпиду, в молекулі якого ковалентно з'єднані з відповідним спиртом. Разом з тим, в невеликих кількостях кислоти виявляються й у вільній формі (НЕЖК – неестерифіковані жирні кислоти).

Жирними кислотами взагалі вважаються монокарбонові кислоти, починаючи з масляної кислоти (C4), хоча кислоти, отримані безпосередньо з тваринних жирів, мають вісім (каприлова кислота) та більше атомів карбону. Всі жирні кислоти умовно поділяються на **нижчі** (до 7 атомів карбону), **середні** (8-12 атомів карбону) та **вищі** (більше дванадцяти атомів). Насичені жирні кислоти з довжиною ланцюга понад 10 атомів вуглецю при кімнатній температурі є твердими речовинами, а ненасичені – рідинами. В організмі людини найпоширеніші насичені жирні кислоти – це пальмітинова (C16) і стеаринова (C18). Більш короткі (C12-C14) та наддовгі (C24-C28) кислоти зустрічаються лише в невеликій кількості. Кількість атомів карбону в природних вищих жирних кислотах в основному парна, що, головним чином, зумовлене особливостями їх біосинтезу за участю двохвуглецевого ацетил-КоА.

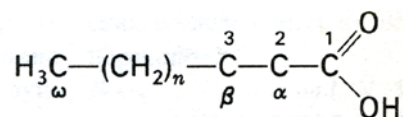
З різних ліпідів виділено понад 300 жирних кислот, які відрізняються між собою за довжиною ланцюга, числом і положенням подвійних зв'язків, а також наявністю в вуглеводневих ланцюгах деяких з них гідрокси- чи кето-груп, бокових розгалужень, циклічних структур та ін.

Вищі жирні кислоти малозчинні у воді, а їх натрієві і калієві солі (мила) – розчинні, Вони є детергентами (поверхнево-активними речовинами), легко утворюють міцели.

За властивостями вищі жирні кислоти – це амфифільні сполуки, які містять одну гідрофільну карбоксильну групу, яка досить легко депротонується (особливо в лужному середовищі), і довгий гідрофобний вуглеводневий ланцюг. Оскільки кути між одинарними валентними зв'язками у вуглеводневому ланцюгу кислот складають 109°, структурну формулу будь-якої насиченої кислоти зображують у вигляді зигзагоподібної прямої ламаної лінії, атоми карбону в якій нумерують, починаючи з карбоксильної групи. Нижче наведена структурна формула пальмітинової (C16) кислоти з нумерацією атомів:



Застосовується також ще один спосіб нумерації атомів карбону вуглеводневого ланцюга жирних кислот за допомогою маленьких літер грецького алфавіту, причому в такому випадку позначення починається з атома вуглецю, сусіднього з карбоксильною групою (!). Особливості цих двох варіантів нумерації представлені на схемі:



Ковалентні зв'язки між атомами карбону в молекулах жирних кислот можуть бути одинарними або подвійними. Вуглеводнені ланцюжки кислот з одинарними зв'язками мають максимально можливу кількість атомів водню, тому такі кислоти називаються **насиченими**. Кислоти з одним подвійним зв'язком в їх ланцюжку іменують **мононенасиченими**, а з двома та більше подвійними зв'язками, які розташовуються в їх молекулі через одну метиленову (–CH₂–) групу, – **поліненасиченими**.

Жирині кислоти розрізняються за кількістю атомів карбону в ланцюзі, а ненасичені кислоти – ще й за кількістю і положенням подвійних зв'язків в молекулі та за їх конформацією. Як правило, в природніх кислотах – це **цис**-конформація, тобто обидва ацильні фрагменти в їх молекулі знаходяться по одну сторону подвійного зв'язку. Така конфігурація робить вуглеводневий ланцюг ненасиченої жирної кислоти вкороченим в довжину та вигнутим, що порушує впорядковане розташування насичених радикалів жирних кислот в фосфоліпідах мембран, знижує температуру плавлення і ін. Жирині кислоти з декількома подвійними зв'язками займають більший геометричний простір в ліпідному бішарі мембран та є більш жорсткими, ніж насичені кислоти.

До найбільш поширених **насичених** ВЖК відносяться:

- пальмітинова (C16:0)
- стеаринова (C18:0)
- арахінова (C20:0)

до **мононенасичених**:

- пальмітоолеїнова (C16:1, Δ9)
- олеїнова (C18:1, Δ9)

до **поліненасичених**:

- лінолева (C18:2, Δ9,12)
- α-ліноленова (C18:3, Δ9,12,15)
- арахідонова (C20:4, Δ5,8,11,14)

Перша цифра в дужках вказує на **кількість атомів вуглецю (C)** в молекулі ВЖК, друга цифра (після двокрапки) – на **кількість ненасичених зв'язків** в ній, а цифри після Δ – місця їх розташування.

Існує два способи їх нумерації: традиційний **хімічний** (ЮПАК) – відносно першого атому вуглецю ланцюга (позначається через грецьку букву Δ "дельта") та **біохімічний (біологічний)** – відносно його останнього атому (позначається буквою ω "омега"). Це зумовлене тим, що фізіологічні властивості незамінних полієнових жирних кислот залежать, головним чином, від найбільш віддаленого від карбоксильної групи подвійного зв'язку, положення якого залишається незмінним при їх метаболізмі. Тому біохіміки зазначають загальну кількість атомів вуглецю, кількість подвійних зв'язків і вказують положення лише найбільш віддаленого подвійного зв'язку, наприклад для α-ліноленової кислоти – це 18:3 ω-3 (для порівняння в ЮПАК вона позначається – C18:3, Δ9,12,15). Таким чином з'явилися певні біогенетичні родини кислот, які називають **ω-3**, **ω-6** та **ω-9** ненасиченими кислотами, що вказує на шлях їх біосинтезу і метаболізму. Найбільше значення мають перші два сімейства, котрі власне і є незамінними (есенціальними):

ω3-жирні кислоти (містяться в риб'ячому жирі):

- α-ліноленова (C18:3, Δ9,12,15)
- тімнодонова (ейкозопентаєнова, C20:5, Δ5,8,11,14,17)
- клупанодонова (докозопентаєнова, C22:5, Δ7,10,13,16,19)
- цервонова (докозогексаєнова, C22:6, Δ4,7,10,13,16,19).

ω6-жирні кислоти (містяться в рослинних оліях, об'єднані під назвою **вітамін F**):

- лінолева (C18:2, Δ9,12)
- γ-ліноленова (C18:3, Δ6,9,12)
- арахідонова (ейкозотетраєнова, C20:4, Δ5,8,11,14).

Насичені жирні кислоти входять до складу нейтральних жирів, де виконують функцію депонування енергії. В протизагу цьому, головним структурним компонентом внутрішнього гідрофобного шару біологічних мембран, що визначає властивості мембран в цілому, є переважно ненасичені жирні кислоти фосфоліпідів та сфінголіпідів.

Вищі жирні кислоти, які входять до складу простих та складних ліпідів, характеризуються наступними найбільш характерними особливостями:

- є монокарбонними

- містять парне число вуглецевих атомів в ланцюгу
- їх вуглеводневі ланцюги лінійні (відсутність розгалужень)
- характерна цис-конформація подвійних зв'язків (за їх наявності)
- якщо в складі жирної кислоти є два та більше подвійних зв'язків, то вони розташовуються через метиленову (-CH₂-) групу.

Вміст вищих жирних кислот в харчовому раціоні повинен бути збалансованим: 10-20% поліненасичених, 50-60% мононенасичених і 30% насичених жирних кислот. Це співвідношення забезпечується при використанні 1/3 рослинних і 2/3 тваринних жирів.

Особливості структури та назви найпоширеніших в природі ВЖК представлені в таблиці на наступній сторінці.

Катаболізм насичених вищих жирних кислот з парним числом атомів карбону

При потребі клітин в енергії, в адипоцитах (під дією адреналіну, глюкагону, адренкортикотропіну та ін.) запускається процес ліполізу тригліцеридів, і вивільнені з них вищі жирні кислоти, переважна більшість яких є насиченими та з парним числом атомів карбону, виділяються в кровотік. Отримання енергії відбувається шляхом їх подальшого окислення в мітохондріях. Загальновізнаною теорією, яка пояснює механізм окислення жирних кислот в організмі, є теорія німецького біохіміка Франца Кнопа (1904), котрий одним з перших звернув увагу, що до складу природних жирів завжди входять жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів. Цей факт він пояснив тим, що жирні кислоти в організмі можуть переходити одна в одну чи метаболізуватись, одномоментно втрачаючи або приєднуючи щоразу не менше двох атомів вуглецю. Звідси випливає, зокрема, що при їх окисленні хімічні перетворення відбуваються з третім від карбоксильної групи кислоти (β-атомом) карбону, тому Ф. Кнооп назвав даний процес **β-окисленням жирних кислот**.

Просторово і функціонально β-окислення тісно пов'язане з циклом трикарбонових кислот та дихальним ланцюгом – воно активно протікає в мітохондріях клітин лише в аеробних умовах.

Тривіальна назва, брутто-формула	Назва за Женевською номенклатурою, структурна формула
Насичені	
Пальмітинова C ₁₅ H ₃₁ COOH	Гексадеканова CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -C(=O)OH
Стеаринова C ₁₇ H ₃₅ COOH	Октадеканова CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -C(=O)OH
Ненасичені	
Олеїнова C ₁₇ H ₃₃ COOH	9-Октадецена CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -C(=O)OH
Лінолева C ₁₇ H ₃₁ COOH	9,12-Октадекадієнова CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -C(=O)OH
Ліноленова C ₁₇ H ₂₉ COOH	9,12,15-Октадекатрієнова CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -C(=O)OH
Арахідонова C ₁₉ H ₃₁ COOH	5,8,11,14-Ейкозатетраєнова CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -C(=O)OH

Доставка жирних кислот до місць їх окислення відбувається досить складним шляхом:

- транспорт кров'ю здійснюється за участю альбумінів
- в межах цитозолу жирні кислоти переносяться спеціальними білками-транспортерами FABP (**fatty acid binding proteins**)
- їх трансмембранний перенос з цитозолу в мітохондрії здійснюється за допомогою **карнітину**.

За механізмом протікання, β -окислення вищих жирних кислот – це процес поступового вкорочення довгого вуглеводного ланцюга молекули певної жирної кислоти внаслідок послідовних повторних ферментативних відщеплень від неї двовуглецевих фрагментів у вигляді активної форми оцтової кислоти – **ацетил-КоА**. Таким чином, β -окислення ВЖК протікає у вигляді **ітерацій**, тобто багаторазових повторень однакових дій (хімічних перетворень).

Теорія Ф. Кноопа в загальному правильно пояснила сутність процесу, проте важливими є два уточнення. По-перше, для того, щоб піддатися катаболізму, жирна кислота повинна активуватись. По-друге, «відрізання» двох атомів вуглецю від її молекули – це не одномоментне явище, а досить складний багатастадійний циклічний процес, який відбувається в чотири етапи.

В цілому катаболізм ВЖК представляє собою ряд послідовних стадій:

- активація жирних кислот – утворення ацил-КоА (відбувається в цитоплазмі клітин) і є енергозатратною (забезпечується енергією гідролізу макроергічних зв'язків АТФ)
- трансмембранний перенос ацил-КоА (транспортування через подвійну мембрану мітохондрії за допомогою карнітину)
- власне сам процес його β -окислення в матриксі мітохондрій з утворенням певної кількості молекул ацетил-КоА (в залежності від числа атомів карбону в молекулі ВЖК) та відновлених форм коферментів дегідрогеназ – ФАД-Н₂ і НАД-Н
- окислення ацетил-КоА в циклі трикарбонових кислот до CO₂ і H₂O.

На **I стадії** здійснюється активація жирних кислот шляхом їх зв'язування з коферментом А за участю відповідних **ацил-КоА-синтеаз (тіокіназ)** з використанням енергії АТФ. Реакція протікає в два етапи і вимагає присутності АТФ, HS-КоА та Mg²⁺. Спочатку жирна кислота взаємодіє з АТФ з утворенням **ациладенілату**, який потім безпосередньо реагує з HS-КоА. На сьогодні відомі декілька тіокіназ, специфічних до жирних кислот з різною довжиною вуглеводного ланцюга. Ці ферменти в клітинах прокариот прикріплені до клітинної мембрани, а в еукаріот – до зовнішньої мембрани мітохондрій.

При цьому АТФ гідролізується до АМФ (!) з вивільненням двох залишків фосфатної кислоти.

На **II стадії** утворений ацил-КоА переноситься через мембрану мітохондрій за допомогою карнітину (β -гідрокси- γ -триметиламіномасляна кислота) та ферментів карнітин-ацилтрансфераз: в цитозолі (за участі цитозольної карнітин-ацилтрансферази I) утворюється ацилкарнітин, який здатний транспортуватися через мембрану мітохондрій, а в мітохондріях під дією аналогічної мітохондріальної карнітин-ацилтрансферази II відбувається зворотній процес, і ацил-КоА вивільняється. Особливо велике значення для організму карнітин має у внутрішньоутробному періоді і в перші роки життя.

III стадія (власне процес β -окислення), як зазначалось, включає в себе декілька послідовних етапів, які циклічно повторюються, щоразу призводячи до утворення ацетил-КоА та вкорочення вуглеводного ланцюга вихідної жирної кислоти на 2 атоми карбону.

Перший етап – **дегідрогенізація (дегідрування)**. Від кожного з двох атомів вуглецю, сусідніх з карбоксильною групою (C2 і C3 або α - та β -атоми), відщеплюється по протону й електрону – отже ці карбони окислюються. При цьому утворюється ненасичена

(*транс- $\Delta^{2,3}$ -енольна*) похідна кислоти, яка вступила в процес окислення, тобто між C3 і C2 атомами карбону в її вуглеводневому ланцюзі з'являється подвійний зв'язок ($-C_3=C_2-$). Даний процес відбувається під дією **ФАД-залежних ацил-КоА-дегідрогеназ** (КФ 1.3.8.8.); в якості простетичної групи вони містять **флавінаденіндинуклеотид** (активну форму вітаміну B2). В окисленні жирних кислот беруть участь коротко-, середньо-, довго- і дуже довго-ланцюжкові ацил-КоА-дегідрогенази. Три перші з них відносяться до ферментів мітохондріального матриксу, а остання є ензимом, пов'язаним з мітохондріальною мембраною. Відновлений в цій реакції **ФАД-Н₂** передає отримані ним протони й електрони на кофермент Q дихального ланцюга.

Другий етап – **гідратація**. До утвореного подвійного зв'язку ($-C_3=C_2-$) приєднується вода, причому так, що її гідроксильна група розташовується біля C3 атому вуглецю (**β -вуглець**), а гідроген – біля C2 атому. Таким чином, за участю ферменту **еноіл-КоА-гідратази** утворюється **β -гідрокси-похідна** вищої жирної кислоти. Реакція стереоспецифічна – продукт, що утворився, має **L-форму**.

На третьому етапі відбувається повторне окислення (**дегідрогенізація**), але, на відміну від попереднього випадку, обидва протони та електрони відщеплюються від одного атому – **β -вуглецю (!)**, тобто його гідроксильна група ($C-OH$) окислюється до карбонільної ($C=O$), і, відповідно, **β -гідрокси-похідна** вищої жирної кислоти перетворюється в її **β -кето-похідну**. Ця реакція каталізується **НАД-залежною L- β -гідроксиацил-дегідрогеназою** (КФ 1.1.1.35). Як і при попередньому окисленні, відновлений кофермент **НАД-Н** передає отримані ним протон та електрони на дихальний ланцюг.

На четвертому етапі від **β -кето-похідної** відділяється двовуглецевий фрагмент у вигляді ацетил-КоА, а нова (вкорочена на два атоми карбону!) жирна кислота конденсується з коферментом А і відправляється на наступну ітерацію циклу, де всі етапи повторюються з нею в тій же послідовності. Дана реакція каталізується **ацил-КоА-ацилтрансферазою (β -кетотіолазою)**.

Кінцевими продуктами кожного такого циклу є **ФАД-Н₂**, **НАД-Н**, які передають отримані протони і електрони в дихальний ланцюг для синтезу АТФ, і ацетил-КоА. Таким чином, наприклад, стеаринова (C18) кислота врешті-решт перетворюється на дев'ять молекул ацетил-КоА (9xС2), причому це відбувається за вісім (!) послідовних відщеплень двовуглецевих фрагментів. Сумарне рівняння окислення стеаринової кислоти має наступний вигляд:



Накінець, на заключній **IV стадії** кожна з молекул ацетил-КоА конденсується з щавлево-оцтовою кислотою з утворенням лимонної кислоти, вступаючи, таким чином, в цикл трикарбонових кислот Кребса, де повністю окислюється до кінцевих сполук (вуглекислого газу та води).

Особливості β -окислення ненасичених жирних кислот.

В загальному плані, такі вищі жирні кислоти окислюються за тим же механізмом, що й насичені жирні кислоти з парним числом атомів карбону. Зокрема, процеси їх транспортування кров'ю, активації (утворення ацил-КоА) та переносу в мітохондрії за допомогою карнітину співпадають повністю. Певні розбіжності виникають на деяких стадіях III етапу та на IV етапі. Всі вони обумовлені відмінностями в структурі їх вуглеводневих ланцюгів. Загалом, швидкість катаболізму таких кислот набагато вища, ніж насичених, що обумовлено наявністю подвійних зв'язків. Якщо взяти за еталон швидкість окислення стеаринової кислоти, то швидкість окислення олеїнової в 11, лінолевої в 114, ліноленої в 170, а арахідонової майже в 200 разів вища.

Окислення ненасичених кислот до місця розташування першого подвійного зв'язку протікає аналогічно β -окисленню насичених ВЖК. Але при цьому, послідовне відщеплення двовуглецевих фрагментів до подвійного зв'язку часто дає $\Delta^{3,4}$ -еноіл-КоА, а не потрібний для продовження деградації ВЖК $\Delta^{2,3}$ -еноіл-КоА, тому необхідне переміщення

подвійного зв'язку (перетворення ненасичених 3,4-ізомерів в 2,3-ізомери). Крім цього, в багатьох природних ненасичених кислотах один чи декілька подвійних зв'язків мають *цис*-конфігурацію. А для участі в β -окисленні необхідна їх *транс*-конфігурація (адже субстратом для ферменту єноіл-КоА-гідратази в циклах ітерації є *транс*- $\Delta^{2,3}$ -єноіл-КоА). Тому, крім переміщення даного зв'язку необхідна ще й зміна його конфігурації – перевод *цис*- в *транс*-форму. На сьогодні вважається, що обидва ці перетворення каталізуються одним ферментом $\Delta^{3,4}$ -*цис*- $\Delta^{2,3}$ -*транс*-єноіл-КоА-ізомеразою (КФ 5.3.3.8), оскільки вони відбуваються одночасно.

В випадках, коли вище зазначені перетворення неможливі, такі подвійні зв'язки частково відновлюються за допомогою **НАДФ-залежної 2,4-дисульфол-КоА-редуктази** (КФ 1.3.1.34), при цьому з двох таких зв'язків утворюється один, розташований між ними, і подальша деградація видозміненої жирної кислоти відбувається за звичайним механізмом.

Інколи буває потрібний ще один додатковий фермент **β -гідроксиацил-КоА-епімераза**, який забезпечує зворотні перетворення D, L-стереоізомерів, роблячи їх доступними для дії стереоспецифічної НАДФ-залежної **L- β -гідроксиацил-дегідрогенази** (фермент III етапу процесу β -окислення ВЖК).

Особливості β -окислення жирних кислот з непарним числом атомів карбону

В цілому, жирні кислоти з непарним числом вуглецевих атомів, як і попередні, окислюються таким же чином, як і жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів, з тією лиш різницею, що на останньому етапі β -окислення розщеплюється не «стандартна» **C4- β -кетопохідна**, яка дає дві молекули ацетил-КоА, а **C5- β -кетопохідна**, утворюючи по одній молекулі ацетил-КоА (C2) та пропіоніл-КоА (C3).

Отриманий тривуглецевий фрагмент – пропіоніл-КоА – утилізується в циклі трикарбонових кислот, куди він включається після попереднього перетворення в сукциніл-КоА, яке здійснюється за допомогою трьох послідовних ферментативних реакцій.

Спочатку під дією **пропіоніл-КоА-карбоксілази** (КФ 4.1.1.41) відбувається карбоксилювання пропіоніл-КоА з утворенням **S-метил-малоніл-КоА** (реакція супроводжується гідролізом АТФ). Коферментом цього ферменту служить **біотин** (вітамін В7).

Дана реакція стереоспецифічна – її продуктом є S-ізомер, який за участю **метил-малоніл-КоА-епімерази** (КФ 5.1.99.1) перетворюється в необхідний для подальших дій R-ізомер.

В останній реакції під дією ферменту **метил-малоніл-КоА-мутази** (КФ 5.4.99.2) утворений **R-метил-малоніл-КоА** перетворюється в **сукциніл-КоА**, який далі вступає в цикл Кребса, оскільки є його природним інтермедіатом. Коферментом даної мутази є похідна вітаміну В12 – **дезоксиаденозилціанокобаламін**.

Окрім цього, сукциніл-КоА є одним з вихідних субстратів, необхідних для синтезу **протопорфірину IX** – основи гему, цитохрому C та інших порфіриновмісних сполук. Конденсація сукциніл-КоА та гліцину з утворенням **δ -амінолевулінової кислоти** – перша (визначальна) реакція цього процесу.

Енергоефект β -окислення насичених вищих жирних кислот з парним числом атомів карбону

Обґрунтування формули розрахунку енергоефекту окислення:

- загальна кількість утворених ацетил-КоА (оскільки вони є двохвуглецевими фрагментами) буде дорівнювати числу атомів карбону в молекулі вихідної жирної кислоти поділеному на 2 – позначим його літерою **n**

- при повному окисленні 1 моля ацетил-КоА в циклі Кребса синтезується 12 молей АТФ, значить при окисленні **n** молей ацетил-КоА утвориться **12xn** молей АТФ

- число циклів β -окислення (тобто кількість відщеплень двохвуглецевих фрагментів) буде дорівнювати (**n - 1**), тому що розщеплення залишкового чотирьохвуглецевого ланцюга жирної кислоти навпіл в останньому циклі призводить до утворення одразу 2 двохвуглецевих фрагментів ($C4 : 2 = 2 C2$)

• при кожному циклі β-окислення утворюється по 1 молю відновлених ФАД-Н₂ і НАД-Н. При передачі ними протонів та електронів на дихальний ланцюг сумарно синтезується 5 молей АТФ (2 моля від ФАД-Н₂ та 3 моля від НАД-Н). Значить за (n – 1) циклів синтезується **5x(n – 1)** молей АТФ

Отже, загальна кількість утворених АТФ складе **12xn + 5x(n – 1) = 17xn – 5**.

Проте, як зазначалось, для активації молекул вищих жирних кислот (на I стадії процесу) витрачається енергія гідролізу 1 АТФ до АМФ (!), що за енергозатратами рівносильне «стандартному» розщепленню 2 АТФ до АДФ. Тому з отриманої загальної кількості АТФ необхідно вирахувати 2 АТФ. Таким чином остаточна формула розрахунку енергоефекту β-окислення ВЖК:

$$\Sigma_{\text{АТФ}} = 17xn - 7$$

Загальний енергоефект β-окислення ненасичених вищих жирних кислот в порівнянні з насиченими має всього одну відмінність. Оскільки подвійний зв'язок (один чи декілька) в будь-якій ненасиченій кислоті вже є, то в даних місцях її ланцюгу необхідність першої дегідрогенізації (утворення подвійного зв'язку за участю ФАД) відпадає, а значить в відповідних циклах β-окислення відновлених ФАД-Н₂ не утворюється. Решта реакцій проходять без змін. Кількість «недоотриманих» ФАД-Н₂ відповідає числу подвійних зв'язків, а так як ФАД-Н₂, передаючи протони й електрони на дихальний ланцюг, забезпечує синтез 2 молей АТФ, то кожний подвійний зв'язок в молекулі ВЖК буде знижувати загальний енергоефект процесу її окислення на 2 АТФ, тобто формула його підрахунку в таких випадках буде мати додатковий елемент:

$\Sigma_{\text{АТФ}} = 17xn - 7 - 2m$, де **m** – це кількість подвійних зв'язків в молекулі даної ненасиченої вищої жирної кислоти.

Особливості розрахунку загального енергоефекту β-окислення вищих жирних кислот з непарним числом атомів карбону зумовлені тим, що в результаті тіолазної реакції останнього циклу ітерації в даному випадку утворюються 1 ацетил-КоА (С2) і 1 пропіоніл-КоА (С3). Тому загальна кількість ацетил-КоА, які утворюються при окисленні таких кислот (після віднімання трьохвуглецевого пропіонільного фрагменту) складе:

$$n = (\Sigma \text{ атомів карбону} - 3) : 2.$$

Кількість циклів ітерації в даному випадку співпадає з кількістю утворених ацетил-КоА, адже кожне відщеплення, включаючи й останнє, приводить до отримання 1 ацетильного залишку.

Утворений в останньому циклі ітерації пропіоніл-КоА, як було зазначено, через ряд проміжних ферментативних реакцій перетворюється в сукциніл-КоА, який в циклі Кребса поступово окислюється до щавлево-оцтової кислоти (оксалоацетату), внаслідок чого утворюється 1 макроергічна молекула ГТФ (аналог АТФ) та по одному відновленому НАД-Н і ФАД-Н₂, утилізація яких в дихальному ланцюгу сумарно дає 5 молекул АТФ. Тобто в результаті перетворення сукциніл-КоА в оксалоацетат всього синтезується 5АТФ + 1 ГТФ = 6 макроергів.

Таким чином, загальний енергоефект окислення ВЖК з непарним числом атомів карбону з урахуванням всіх особливостей складе:

$$\Sigma_{\text{АТФ}} = 12xn + 5xn + 6 = 17xn + 6, \text{ де } n = (\Sigma \text{ атомів карбону} - 3) : 2.$$

Синтез вищих жирних кислот в клітинах

В загальному вигляді можна виділити наступні етапи біосинтезу ВЖК:

- утворення в матриксі мітохондрій ацетил-КоА (з глюкози та інших моносахаридів, кетогенних амінокислот або при β-окисленні ВЖК)
- перенесення ацетил-КоА з мітохондрій в цитозоль
- утворення малоніл-КоА шляхом карбоксилювання ацетил-КоА
- власне сам синтез молекули вищої жирної кислоти.

Вихідним субстратом для синтезу жирних кислот в клітинах служить **ацетил-КоА**, котрий в основному надходить в їх цитозоль з мітохондрій, в матриксі яких він

утворюється внаслідок окислювального декарбоксілювання пірувату чи β -окислення ВЖК. Відомо, що ацетил-КоА безпосередньо не може дифундувати в цитозоль клітини, так як мітохондріальна мембрана непроникна для нього. Тому спочатку внутрішньомітохондріальний ацетил-КоА конденсується з **оксалоацетатом**, утворюючи **цитрат**. Ця реакція каталізується ферментом **цитрат-синтазою** (ЕС 2.3.3.1) та є абсолютно ідентичною I реакції циклу Кребса. Утворений цитрат переноситься через мембрану мітохондрій в цитозоль за допомогою спеціальної трикарбоксилат-транспортуючої системи.

В цитоплазмі цитрат (з затратою енергії АТФ!) під дією **АТФ-залежної цитрат-ліази** (ЕС 4.1.3.8) реагує з КоА, знову утворюючи **ацетил-КоА** і **оксалоацетат**. Останній за участю цитозольної **НАД-залежної малатдегідрогенази** (ЕС 1.1.1.37) відновлюється до дикарбонової **яблучної кислоти** (малату). Малат за допомогою дикарбоксилаттранспортуючої системи повертається в мітохондрії, де під дією аналогічної мітохондріальної **НАД-залежної малатдегідрогенази** знову окислюється до оксалоацетату, завершуючи цикл. Цікаво, що протилежні напрямки протікання даної реакції (окислення чи відновлення) в мітохондріях та цитозолі визначаються співвідношенням в них НАД-Н/НАД⁺: так в цитоплазмі воно дуже низьке, тому тут малат легко окислюється до оксалоацетату, підвищуючи концентрацію НАД-Н, а в мітохондріях навпаки – співвідношення НАД-Н/НАД⁺ досить високе, тому оксалоацетат там легко відновлюється в малат, зменшуючи кількість НАД-Н.

Необхідно пам'ятати, що найважливішою умовою переміщення ацетил-КоА з мітохондрій в цитоплазму та використання його для синтезу ВЖК є достатня кількість АТФ в клітині. Якщо АТФ в клітині мало, то ацетил-КоА розщеплюється в циклі Кребса до CO₂ і H₂O, забезпечуючи її енергією.

Слід зауважити, що більш специфічною та важливішою для процесу синтезу ВЖК є **НАДФ-залежна малатдегідрогеназа** (ЕС 1.1.1.82), яка, на відміну від попередніх, переважно знаходиться в цитоплазмі клітин тих тканин, що беруть участь в біосинтезі жирних кислот, оскільки вона (як і **НАДФ-залежна глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа** – фермент пентозофосфатного циклу) постачає не НАД-Н, а НАДФ-Н, а саме вони необхідні для синтезу вищих жирних кислот та холестерину.

Крім того, виявлені найбільш універсальні для синтезу ВЖК декарбоксілюючі малатдегідрогенази – вони забезпечують не лише появу відновлених НАДФ-Н, а й одночасно регулюють рівень **вуглекислого газу**, який також необхідний для даного синтезу. Так в мітохондріях і цитоплазмі гепатоцитів та інших клітин, в яких синтезуються ВЖК і фосфоліпіди, присутня **НАДФ-залежна декарбоксілююча малатдегідрогеназа** (ЕС 1.1.1.40), що каталізує реакцію:



Підготовча реакція синтезу ВЖК – карбоксилування ацетил-КоА (утворення малоніл-КоА) – каталізується мультиферментним комплексом – **ацетил-КоА-карбоксилазою**. Комплекс складається зі змінного числа однакових субодиниць, кожна з яких містить **біотин**, **біотінкарбоксилазу**, **карбоксибіотин-переносячий білок**, **транскарбоксилазу** та регуляторний аллостеричний центр. Реакція протікає в дві стадії:

- карбоксилування біотину за участю АТФ
- перенесення активованої карбоксильної групи на ацетил-СоА з утворенням малоніл-СоА.

Ацетил-СоА-карбоксилаза активується цитратом, а інгібується довголанцюговими ацил-КоА-похідними (ретроінгібування).

Таким чином, для забезпечення безпосередньо самого процесу біосинтезу вищих жирних кислот необхідна наявність в цитоплазмі клітин наступних субстратів: **ацетил-КоА**, **НАДФ-Н**, **CO₂** та **АТФ** (або готового **малоніл-КоА**).

Мультиферментний комплекс «**синтаза вищих жирних кислот**» (або **пальмітат-синтаза**), який фіксований в цитоплазмі на мембранах ендоплазматичного ретикулуму, в

своєму складі містить шість ферментів і спеціальний **ацил-переносячий білок** (АПБ), функція якого полягає в послідовному циклічному переміщенні ацильної групи, що подовжується, від однієї субодиниці ферментативного комплексу до іншої в суворій відповідності з хімізмом процесу. Структурно комплекс «синтаза вищих жирних кислот» складається з двох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких кодується одним геном. Субодиниця А містить ацилпереносячий білок, конденсуючий фермент і β -оксоацилредуктазу, а субодиниця В – ацетилтрансацилазу, малоніл-трансацилазу, β -гідроксиацилдегідратазу та еноїлредуктазу.

Функціональною ланкою АПБ, що приймає безпосередню участь в процесі синтезу, є **6-фосфопантетеїн** (активна форма пантотенової кислоти – вітаміну B₅), який має тіолову (-SH) групу, подібно до КоА-SH. В активному центрі першого зі зв'язаних з АПБ ферментів мультиензимного комплексу – **3-кетואцил-синтази** – також розташована аналогічна тіолова група амінокислоти цистеїну. Взаємодія цих двох функціональних груп обумовлює як початок біосинтезу жирної кислоти, так і подовження її вуглеводного ланцюга в кожному циклі.

Кожний цикл подовження вуглеводного ланцюга жирних кислот включає чотири послідовні аналогічні ферментативні реакції, нижче наведена послідовність реакцій I циклу:

- конденсація ацетил-АПБ з малоніл-АПБ з утворенням С₄-кетопохідної та одночасним декарбоксілюванням
- перше відновлення з утворенням С₄-гідроксипохідної
- дегідратація з утворенням неначиченої С₄-еноїлпохідної
- друге відновлення з утворенням С₄-ацил-АПБ

В першій реакції малонільний залишок з малоніл-КоА передається на тіолову групу фосфопантетеїну АПБ, а залишок оцтової кислоти з ацетил-КоА – на таку ж групу цистеїну активного центру 3-кетואцилсинтази, яка каталізує реакцію конденсації цих двох фрагментів, тобто перенесення ацетильної групи на малоніл з одночасним декарбоксілюванням останнього та утворенням С₄ кетопохідної – ацетоацетил-АПБ.

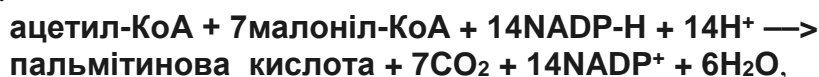
В другій реакції ацетоацетил-АПБ під дією **β -кетואцил-АПБ-редуктази** (КФ 1.1.1.100) перетворюється в **β -гідроксибутиріл-АПБ**. Відновлювальним агентом реакції служить НАДФ-Н (кофактор ферменту).

В третій реакції від β -гідроксибутиріл-АПБ відщеплюється молекула води з утворенням неначиченої С₄-еноїлпохідної – **кротоніл-АПБ**. Реакція каталізується **β -гідроксиацил-АПБ-дегідратазою**.

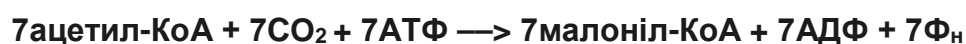
Четвертою (заключною) реакцією циклу є відновлення кротоніл-АПБ до насиченого С₄-ацилу, пов'язаного з фосфопантетеїном, – **бутиріл-АПБ**. Реакція відбувається під дією **еноїл-АПБ-редуктази** (КФ 1.3.1.10). Відновлювальним агентом реакції (кофактором ферменту), як і в попередньому випадку, є НАДФ-Н.

Після цього **ацилтрансфераза** переносить утворений С₄-ацил на сульфгідрильну групу цистеїну 3-кетואцилсинтази, а до вивільненого фосфопантетеїну знову приєднується малоніл-КоА і цикл повторюється. Синтезована за сім таких циклів пальмітинова (С₁₆) кислота відщеплюється шостим ферментом комплексу – **тіоестеразою**.

Сумарне рівняння синтезу пальмітинової кислоти можна записати в наступному вигляді:



Загальні енергозатрати синтезу пальмітинової кислоти визначаються енергозатратними реакціями біотин-залежного карбоксилювання при утворенні малоніл-КоА:



Регуляція синтезу жирних кислот відбувається на рівні **ацетил-КоА-карбоксилази** і мультиферментного комплексу **синтази жирних кислот**.

Регуляція активності ацетил-КоА-карбоксилази здійснюється за рахунок трьох механізмів.

1. Аlostерична регуляція:

- **активатор** ферменту – **цитрат**, збільшення концентрації якого у постсорбційний період активує анаболічні процеси в клітині, тобто запасання надлишків ацетил-КоА у вигляді жирів. За відсутності активатора ензим малоактивний

- **інгібітори** ферменту – кінцеві метаболіти процесу (**пальмітоїл-КоА** та **стеароїл-КоА**), які інгібують власний синтез за принципом негативного зворотного зв'язку.

2. Ковалентна модифікація – активність ензиму регулюється за рахунок ц-АМФ залежного **фосфорилювання** (неактивна форма ферменту) та **дефосфорилювання** (активна форма ферменту), яке відбувається під дією гормонів: інсулін активує ензим, а адреналін, норадреналін, глюкагон його інгібують.

3. Зміна швидкості синтезу ферменту:

- **індукція** – збільшення синтезу ензиму, яке спостерігається при високовуглеводній дієті або споживанні раціону з низьким вмістом ліпідів

- **репресія** – зниження швидкості синтезу ензиму при голодуванні або споживанні збагаченого жирами раціону.

Регуляція активності мультиензимного комплексу синтази жирних кислот (циклу Лінена) здійснюється за рахунок механізмів:

1. Аlostерична регуляція:

- **активатори** ферменту – фосфорильовані моносахариди (глюкозо-6-ф і ін.)

- **інгібітори** ферменту – кінцеві метаболіти процесу (**пальмітоїл-КоА** і **стеароїл-КоА**), які інгібують власний синтез за принципом негативного зворотного зв'язку.

2. Зміни швидкості синтезу окремих ферментів комплексу в умовах голодування та постсорбтивний період.

Окрім всього вищезазначеного, швидкість синтезу жирних кислот контролюється енергетичним станом клітини (співвідношенням АТФ/АДФ) – високі концентрації АТФ стимулюють синтез жирних кислот, а дефіцит АТФ (переважання вмісту АДФ) гальмує цей процес.

Незважаючи на значну подібність ферментів, а також послідовностей та характеру хімічних перетворень в циклах ітерацій при β -окисленні вищих жирних кислот та їх біосинтезі, дані процеси суттєво відрізняються. Головні їх відмінності:

- β -окислення протікає в мітохондріях, а синтез жирних кислот – в цитоплазмі на мембранах гладенького ендоплазматичного ретикулюму

- цитоплазматичні ферменти синтезу ВЖК утворюють єдиний мультиензимний комплекс – синтазу жирних кислот (пальмітат-синтазу), а мітохондріальні ферменти β -окислення діють окремо

- в ході β -окислення кислот проміжні продукти пов'язані з КоА, а при їх синтезі – з особливим ацил-переносним білком (АПБ), простетична частина якого схожа за будовою на КоА і складається з тіоетиламіну, пантотенової кислоти (вітамін В3) і фосфату

- при β -окисленні використовуються НАД і ФАД, як окислювачі, а при синтезі ВЖК – НАДФ-Н в якості відновника

- в процесі біосинтезу жирних кислот бере участь малоніл-КоА, який утворюється з ацетил-КоА шляхом карбоксилювання за допомогою біотин-ферменту і АТФ)

- при біосинтезі ВЖК утворюються D(-)-ізомери відповідних 3-гідроксикислот, а не L(+)-ізомери, як це має місце при β -окисленні жирних кислот.

Елонгація (подовження ланцюгів) вищих жирних кислот.

Пальмітинова кислота (C₁₆), яка утворюється у циклі Лінена, є попередником синтезу більш довголанцюгових вищих жирних кислот (C₁₈, C₂₀, C₂₂, C₂₄). Подовження

ланцюга жирної кислоти відбувається шляхом послідовного приєднання до ацильних радикалів двовуглецевих фрагментів спеціальними ензиматичними системами (*елонгази жирних кислот*), які локалізуються в цитозолі та мітохондріях клітини.

Мікросомальна (цитоплазматична) система елонгації в якості джерела двовуглецевих фрагментів використовує малоніл-КоА і працює за механізмом, подібним до синтази ВЖК. Її субстратами є насичені жирні кислоти з C_{10} та більшою кількістю атомів вуглецю.

Мітохондріальна система елонгації використовує ацетил-КоА, як донора двовуглецевих фрагментів, і подовжує C_{12} - C_{16} жирні кислоти:

Утворення моно- і поліненасичених жирних кислот (десатурація)

Організм людини має досить обмежені можливості щодо перетворення насичених жирних кислот в ненасичені. Ці перетворення відбуваються в мікросомах гепатоцитів і клітин жирової тканини за участю системи *десатурації жирних кислот*. Попередниками двох найбільш поширених в тканинах людини мононенасичених жирних кислот – пальмітоолеїнової ($C_{16:1}$) і олеїнової ($C_{18:1}$), кожна з яких містить один цис-подвійний зв'язок в Δ^9 -положенні вуглеводного ланцюга, є відповідно пальмітинова ($C_{16:0}$) і стеаринова ($C_{18:0}$) кислоти. Утворення цис-подвійного зв'язку відбувається в результаті реакції окислення, яка каталізується головним ферментом системи десатурації – **ацил-КоА-оксигеназою**, котра за механізмом дії є **цитохром b₅**-вмісною монооксигеназою.

Процеси десатурації та елонгації можуть сполучатися і повторюватися, що дає можливість синтезувати різноманітні моно- та поліненасичені жирні кислоти з довшими, ніж у вихідних кислот ланцюгами.

Проте в клітинах людини і тварин (на відміну від рослин!) відсутні десатурази, які утворюють подвійні зв'язки після C_9 -атому вуглецю, рахуючи від карбоксильної групи. Тому в організмі людини не можуть синтезуватися такі поліненасичені жирні кислоти, як **лінолева** $C_{18:2}$ ($\Delta^{9,12}$) та **α -ліноленова** $C_{18:3}$ ($\Delta^{9,12,15}$). Саме ці кислоти відносяться до категорії незамінних (есенціальних) і повинні постійно надходити до організму з їжею. З них під сумісною дією систем десатурації та елонгації, що містяться в ендоплазматичному ретикулюмі гепатоцитів, синтезується багато інших поліненасичених жирних кислот – **γ -ліноленова** $C_{18:3}$ ($\Delta^{6,9,12}$), **ейкозатрієнова** $C_{20:3}$ ($\Delta^{8,11,14}$), **ейкозатетраєнова** $C_{20:4}$ ($\Delta^{5,8,11,14}$), **ейкозопентаєнова** $C_{20:5}$ ($\Delta^{5,8,11,14,17}$), **докозагексаєнова** $C_{22:6}$ ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$) та ін.

Ейкозатрієнова, ейкозатетраєнова (арахідонова) та ейкозопентаєнова кислоти є попередниками **ейкозаноїдів** – біологічно активних речовин (тканинних гормонів) з широким спектром ефектів. І хоча ці кислоти часто також відносять до незамінних, проте, при надходженні до організму достатньої кількості лінолевої та α -ліноленової кислот, потреби людини в усіх вище наведених кислотах повністю задовольняються.

Окрім цього, похідними арахідонової кислоти є всі відомі на сьогодні **ендогенні каннабіноїди** (спеціальні нейротрансмітери ретроградної сигналізації в синапсах ЦНС), найбільш важливі з яких – **анандамід** (етаноламід арахідонової кислоти) та **2-арахідоноіл-гліцерин**.

Відсутність або нестача незамінних жирних кислот в їжі протягом довгого часу, яка може спостерігатися у немовлят, що знаходяться на штучному вигодуванні, або у хворих, життєдіяльність яких підтримується лише за рахунок парентерального харчування, призводить до відставання у рості, розвитку дерматиту. Для запобігання таких ускладнень кількість незамінних жирних кислот повинна становити не менше ніж 1-2% від загальної потреби організму в калоріях.

При голодуванні та нестачі інсуліну процеси елонгації та десатурації суттєво зменшуються.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Особливості будови, загальні принципи класифікації вищих жирних кислот (ВЖК).
2. β -окислення вищих жирних кислот насиченого і ненасиченого ряду. Роль карнітину в транспорті жирних кислот з цитоплазми в мітохондрії.
3. Енергетична цінність β -окислення ВЖК в клітинах.
4. Біосинтез вищих жирних кислот. Особливості складу і функції ацетил-КоА-карбоксилази, пальмітатсинтазного комплексу. Регуляція процесу.
5. Біосинтез мононенасичених вищих жирних кислот в організмі людини.
6. Кетонові тіла. Реакції біосинтезу і утилізації кетонових тіл: локалізація в організмі, біологічне значення. Кетонемія і кетонурія при цукровому діабеті, голодуванні.

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 5

Дата

1. Якісні реакції на кетонові тіла

1.1. Реакція Лібена

Принцип методу: Ацетон реагує в лужному середовищі з йодом, перетворюючись у йодоформ. Про утворення йодоформу дізнаються за специфічним запахом.

Хід роботи:

До 1 мл розчину ацетону додають 5-6 крапель 10% р-ну NaOH і 3-4 краплі реактиву Люголя. Утвориться йодоформ. При великих кількостях ацетону в сечі випадає кристалічний осад йодоформу. Про утворення йодоформу дізнаються за специфічним запахом

Результат:

Висновки:

1.2. Реакція Легалья.

Принцип методу: Ацетон і ацетооцтова кислота в лужному середовищі утворюють з натрію нітропрусидом помаранчево-червоне забарвлення. Після підкислення крижаною оцтовою кислотою утворюється сполука вишневого кольору.

Хід роботи: В пробірку наливають 1 мл ацетону, підлужнюють 10% розчином NaOH і додають 1-5 крапель свіжовиготовленого нітропрусиду натрію. Рідина забарвлюється в червоний колір. Інтенсивність підсилюється від додавання оцтової кислоти.

Результат:

Висновки:

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім описаних якісних реакцій на кетонові тіла, паралельно виконується їх визначення на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть білки крові, що транспортують жирні кислоти:

- A. Глобуліни
- B. Гемоглобін
- C. Альбуміни
- D. α -Ліпопротеїни
- E. β -Ліпопротеїни

2. Укажіть локалізацію процесу β -окислення жирних кислот у клітині:

- A. Ядро
- B. Цитозоль
- C. Мітохондрії
- D. Лізосоми
- E. Апарат Гольджи

3. Назвіть вітаміноподібну речовину, що бере участь у транспорті жирних кислот з цитоплазми у мітохондрії:

- A. Коензим А
- B. Карнітин
- C. Біотин
- D. Пантотенова кислота
- E. Фолієва кислота

4. Укажіть на скільки атомів вуглецю стає коротшим вуглецевий ланцюг вищих жирних кислот за один цикл β -окислення:

- A. 3
- B. 4
- C. 2
- D. 1
- E. 0

5. Виберіть додатковий фермент, необхідний для окислення ненасичених жирних кислот:

- A. $\Delta^{3,4}$ – цис – $\Delta^{2,3}$ - транс-еноїл – КоА - ізомераза
- B. Ацил –КоА- дегідрогеназа
- C. Еноїл – КоА - гідратаза
- D. Оксіацил – КоА - дегідрогеназа
- E. Тіолаза

6. Укажіть кінцевий продукт β -окислення жирних кислот з непарним числом вуглецевих атомів:

- A. Сукциніл-КоА
- B. Ацетил-КоА
- C. Ацетоацетил-КоА
- D. Пропіоніл-КоА
- E. Оксиметилглутарил-КоА

7. Вкажіть представника кетонових тіл в організмі:

- A. Оцтова кислота
- B. Масляна кислота
- C. Пальмітинова кислота

D. Олеїнова кислота

E. Ацетооцтова кислота

8. Укажіть місце синтезу кетонів в організмі:

A. Печінка

B. Нирки

C. М'язи

D. Підшлункова залоза

E. Легені

9. Назвіть продукт, що утворюється при конденсації двох молекул ацетил-КоА у процесі біосинтезу кетонів:

A. Оксипутират

B. Ацетоацетат

C. Ацетон

D. Сукциніл-КоА

E. Ацетоацетил-КоА

10. Виберіть патологію, при якій спостерігається кетонемія в організмі:

A. Інфаркт міокарду

B. Атеросклероз

C. Цукровий діабет

D. Ревматизм

E. Гострі вірусні інфекції

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 6

1. ТЕМА: Ліпопротеїни плазми крові. Визначення ліпопротеїнів та лабораторна діагностика атеросклерозу

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Особливості метаболізму окремих груп ліпопротеїнів можуть суттєво змінюватись при порушенні процесу їх обміну. Такі захворювання людини, як гіпертонія, ішемічна хвороба серця, інсульти головного мозку, інсулін-незалежний цукровий діабет, ожиріння відповідно до молекулярного механізму багато в чому обумовлені дисбалансом у вмісті ліпідів і ліпопротеїнів плазми крові (ЛПНЩ, ЛПДНЩ, ЛПДВЩ), якій діагностують як дисліпопротеїнемію (зміна від норми процентного відношення вмісту фракцій ліпопротеїнів плазми крові). Висока частота виникнення вищевказаних патологій у цивілізованих країнах світу вимагає від майбутнього лікаря ретельного вивчення питань про причини виникнення дисліпопротеїнемії та особливості їх діагностики.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Оцінити стан ліпідного обміну за показниками холестерину у різних класах ліпопротеїнів крові та встановити їхнє значення у розвитку атеросклерозу

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Оскільки ліпіди є гідрофобними молекулами, то практично всі вони (за виключенням вільних вищих жирних кислот) транспортуються в плазмі крові в складі особливих частинок – ліпопротеїнів.

Ліпопротеїни – це комплексні структури, до складу яких входять різні ліпіди та білки, пов'язані між собою гідрофобними і електростатичними взаємодіями.

За місцеположенням всі ліпопротеїни умовно розподіляють на **вільні ліпопротеїни** (розчинені у водному середовищі – ліпопротеїни плазми,моло-ка, жовтка яєць і ін.) та **структурні ліпопротеїни** (ліпопротеїни мембран клітин, мієлінової оболонки нервів і т.п.). Найбільш вивчені ліпопротеїни плазми крові. Їх загальний вміст та співвідношення різних фракцій служить важливим діагностичним тестом при цілому ряді захворювань.

Існує декілька класифікацій ліпопротеїнів, заснованих на відмінностях в їх білковому складі та фізико-хімічних властивостях (щільності, швидкості флоатації, електрофоретичній рухливості та ін.). Найбільш поширені класифікації, які базуються на поведінці окремих ліпопротеїнів в гравітаційному полі в процесі ультрацентрифугування з застосуванням набору солей певної щільності та різниці їх електрофоретичної рухливості. За цими двома критеріями розрізняють наступні фракції ліпопротеїнів плазми крові:

а) в залежності від їх щільності:

- ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ)
- ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ)
- ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ)
- хіломікрони (ХМ).

б) за електрофоретичною рухливістю (*відповідно до фракції глобулінів, з якою вони рухаються*):

- α -ліпопротеїни (відповідають ЛПВЩ) – мають максимальний пробіг
- β -ліпопротеїни (відповідають ЛПНЩ)
- пре- β -ліпопротеїни (відповідають ЛПДНЩ)
- хіломікрони (залишаються на старті, практично не рухаючись).

В обох випадках розподіл ліпопротеїнів базується на співвідношенні ліпідів та білків, що входять до їх складу.

Крім цього, виділяють ще перехідну форму, що з'являється в плазмі в процесі перетворення ЛПДНЩ в ЛПНЩ, – це ліпопротеїни проміжної щільності (ЛППЩ), які за певних обставин мають важливе діагностичне значення.

Властивості ліпопротеїнів різних класів залежать від виду та кількості білків-апопротеїнів, а також від загальної кількості ліпідів та співвідношення їх фракцій (триацилгліцеролів, фосфоліпідів, холестеролу і його ефірів).

Ліпопротеїни мають **міцелярну будову**. Їх міцели складаються з гідрофільного зовнішнього шару та гідрофобного «ядра».

Гідрофільний поверхневий шар забезпечує розчинність міцели в цілому. Його формують **фосфоліпіди**, неетерифікований **холестерол** та спеціальні білки (**апопротеїни**). При цьому, фосфоліпіди та холестерин розташовані в зовнішній оболонці впорядковано – їх полярні групи орієнтовані назовні (до водного середовища), а гідрофобні жирнокислотні «хвости» – всередину міцели. Товщина зовнішньої оболонки ліпопротеїдів – 2,1-2,2 нм, що відповідає половині товщини ліпідного бішару клітинних мембран, тобто зовнішня оболонка ліпопротеїнів плазми (на відміну від клітинних мембран) є ліпідним моношаром.

Ядро формують неполярні **ефіри холестеролу** та **триацилгліцероли** (ТАГ). Також до центру ядра повернені гідрофобні вуглеводневі ланцюги жирних кислот фосфоліпідів і поліциклічна частина холестеролу.

Транспортна функція ліпопротеїнів плазми включає:

1. **Перенесення до клітин** різних тканин і органів:

• **насичених і мононенасичених жирних кислот** (в складі **триацил-гліцеролів**) для їх подальшого депонування або безпосереднього використання в якості енергетичних субстратів:

• **поліненасичених жирних кислот** в складі ефірів холестеролу для використання клітинами в синтезі фосфоліпідів та утворення ейкозаноїдів

• **холестеролу** для використання в якості мембранного матеріалу

- **фосфоліпідів** для використання в якості мембранного матеріалу.

Причому, хіломікрони та ЛПДНЩ відповідальні, в першу чергу, за транспорт вищих жирних кислот в складі ТАГ, а ліпопротеїни низької та високої щільності – за транспорт вільного холестеролу і жирних кислот в складі його ефірів. Крім того, ЛПВЩ здатні також віддавати клітинам частину своїх фосфоліпідів.

2. **Видалення надлишку холестеролу** з мембран клітин.
3. **Транспорт жиророзчинних вітамінів.**
4. **Перенесення стероїдних гормонів.**

Характеристика білків-апопротеїнів

Функціональні особливості будь-якого ліпопротеїну визначаються наявністю в його структурі певних **білків-апопротеїнів**, серед яких виділяють кілька типів – **апоА, апоВ, апоС, апоD, апоЕ**. В складі ліпопротеїнів будь-якої фракції знаходяться відповідні йому апобілки, кожен з яких виконує одну або декілька специфічних функцій. В залежності від цього всі апопротеїни розподіляються на наступні групи:

1. **Апопротеїни зі структурною функцією** (зв'язують ліпіди і формують білок-ліпідні комплекси – ліпопротеїни):

- апоВ-48 – фіксує триацилгліцероли
- апоВ-100 – приєднує триацилгліцероли та ефіри холестерину
- апоА-I – акцептує фосфоліпіди
- апоА-IV – зв'язує холестерол.

2. **Апопротеїни з кофакторною функцією** (впливають на активність ферментів метаболізму ліпопротеїнів в крові):

- апоА-I, апоА-II та апоС-I – кофактори ферменту **лецитин-холестерол-ацилтрансферази (ЛХАТ)**
- апоС-II – кофактор **гепарин-залежної ліпопротеїнліпази**
- апоС-III – кофактор **печінкової ТАГ-ліпази** і інгібітор **ліпопротеїн-ліпази**
- апоЕ – інгібітор **ліпопротеїнліпази**.

3. **Апопротеїни з векторною функцією** (визначають головний напрямок транспорту ліпопротеїнів та їх переміщення):

- апоВ-48, апоВ-100 і апоА-I – зв'язуються зі специфічними рецепторами клітин-мішеней
- апоЕ – допомагає взаємодії векторних апобілків з рецепторами.

Всі зазначені апобілки досить різні за структурою та розміром. Так наприклад, апоС-I, С-II і С-III – невеликі поліпептиди, які можуть легко переходити від одного ліпопротеїну до іншого. Структура і вміст кожного з апобілків, внаслідок їх провідного значення для функціональної повноцінності ліпопротеїнів, знаходиться під генетичним контролем, а вміст ліпідів регулюється, головним чином, дієтичними й іншими чинниками.

Характеристика головних фракцій ліпопротеїнів плазми

Хіломікрони. Головна їх функція – це **транспорт екзогенних ТАГ** з кишечника в тканини, які використовують або запасують вищі жирні кислоти (в основному, це жирова тканина, міокард, скелетні м'язи, лактуючі молочні залози, в меншій мірі – легені, кістковий мозок, нирки, селезінка).

Спочатку в ентероцитах формуються первинні хіломікрони, що мають тільки апоВ-48. Через великі розміри вони не можуть проникнути безпосередньо в капіляри кровоносних судин кишечника, а потрапляють в судини його лімфатичної системи, по яких рухаються певний проміжок часу, остаточно формуючись, та поступають в кров через лівий венозний кут (місце злиття лівої внутрішньої яремної вени і лівої підключичної вени), куди впадає ліва грудна лімфатична протока. В плазмі крові вони взаємодіють з ЛПВЩ, утворюючи зрілі форми шляхом додаткового отримання від ЛПВЩ апопротеїнів (апоС-II, апоЕ) та обміну частини своїх МАГ і ДАГ на ефіри ХС. АпоС-II –

це активатор ліпопротеїнліпази, а апоЕ забезпечує поглинання залишкових хіломікронів гепатоцитами, тобто видалення їх з крові

На ендотелії капілярів різних тканин активно функціонує фермент **ліпопротеїнліпаза**. Вона поступово (по мірі переміщення хіломікронів кров'ю) відщеплює від молекул їхніх ТАГ вищі жирні кислоти в положеннях 1 і 3, в результаті накопичуються моно- та диацилглицероли. Ліпопротеїнліпаза здатна видалити до 90% всіх ТАГ, що знаходяться в хіломікронах. Після вивільнення вищі жирні кислоти проникають в клітини даної тканини або залишаються в плазмі крові і в комплексі з альбуміном розносяться нею до інших тканин. Ремнантні (залишкові) хіломікрони з залишками МАГ і ДАГ потрапляють в гепатоцити шляхом апоЕ-залежного рецепторного ендоцитозу і розпадаються там до складових частин.

В жировій тканині – основному місці депонування резервних ТАГ – кількість ліпопротеїнліпази збільшується в абсорбтивний період під впливом інсуліну, а в постабсорбтивний період – адреналіну та глюкагону.

Хіломікрони характеризуються:

- найбільшими серед ліпопротеїнів розмірами – 0,1-1,0 мкм
- в їх складі переважають ТАГ (85-90%), вміст білків дуже низький – 1-2%, крім цього містять до 5% ХС і його ефірів ХС та 3-4% фосфоліпідів
- їх основним початковим апобілком є апоВ-48, а в плазмі крові від ЛПВЩ додатково отримують ще апо А, С і Е
- в нормі в крові натще відсутні, з'являються лише після прийому їжі, поступаючи з лімфи через грудну лімфатичну протоку та повністю зникають через 10-12 годин
- не атерогенні (!).

Ізольована гіперхіломікронемія зустрічається рідко і, зазвичай, свідчить про **спадковий дефект ліпопротеїнліпази**. Гіперхіломікронемія не є біохімічним маркером атеросклерозу (хіломікрони не атерогенні), але гіпертригліцеридемія, яка спостерігається при ній, може спровокувати розвиток гострого панкреатиту.

Ліпопротеїни дуже низької щільності. Головна їх функція – **транспорт** переважно **ендогенних** та **екзогенних** (які транзитом потрапили в гепатоцити) ТАГ від печінки в тканини, що використовують або запасують жирні кислоти (тобто в ті ж тканини, що й хіломікрони).

Ліпопротеїни дуже низької щільності формуються в печінці з ендогенних і екзогенних ліпідів. Вони характеризуються:

- середні розміри – 0,05 мкм
- в їх складі також, хоча в меншій мірі, переважають ТАГ (біля 65%), вміст білків досить низький – біля 10%, окрім цього містять до 13% ХС і його ефірів та 12% фосфоліпідів
- їх основним початковим апобілком є апоВ-100, а в плазмі крові від ЛПВЩ додатково отримують ще апоС і апоЕ
- слабо атерогенні.

Загалом (внаслідок подібності їх функцій) метаболізм ліпопротеїнів даної групи багато в чому аналогічний попереднім.

Первинні ЛПДНЩ утворюються в печінці і спочатку містять тільки апоВ-100. Їх ліпідний компонент утворюється з ендогенних ліпідів, синтезованих з проміжних продуктів (інтермедіатів) обміну глюкози, а також з харчових ліпідів та МАГ і ДАГ, які надійшли в гепатоцити з залишковими (ремнантними) хіломікронами. В плазмі крові первинні ЛПДНЩ трансформуються, взаємодіючи з ЛПВЩ, від яких отримують апоС-II і апоЕ та віддають їм частину своїх МАГ і ДАГ взамін на ефіри ХС. Аналогічно хіломікронам, на ендотелії капілярів ряду тканин зрілі ЛПДНЩ піддаються дії ліпопротеїнліпази з вивільненням вищих жирних кислот, які поглинаються клітинами даної тканини або залишаються в плазмі і в комплексі з альбумінами переносяться кров'ю

до інших тканин. Таким чином ЛПДНЩ трансформуються в ліпопротеїни проміжної щільності (ЛППЩ), метаболізм яких в подальшому йде по двох напрямках (в співвідношенні приблизно 1:1): вони або перетворюються (після додаткового екстрагування з них ТАГ печінковою ліпазою) в наступний клас ліпопротеїнів – ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ), або шляхом ендоцитозу за допомогою змішаного рецептору до апоЕ і апоВ-100-білків потрапляють в гепатоцити, де руйнуються.

Прискорення катаболізму та/або зменшення синтезу ЛПДНЩ лежить в основі холестерин-знижуючого ефекту двох груп гіполіпідемічних препаратів – нікотинової кислоти і фібратів.

Ліпопротеїни низької щільності. Їх функції:

1. Транспорт холестеролу в клітини, що використовують його для синтезу глюкокортикоїдів і мінералокортикоїдів (кора надниркових залоз), статевих гормонів (статеві залози), холекальциферолу (шкіра) або в печінку, яка утилізує ХС до **жовчних кислот**.

2. Транспорт полієнових жирних кислот (ПНЖК) у вигляді ефірів ХС в епітелій гломерулярної мембрани нирок, в клітини кісткового мозку, гладеньких м'язів, рогівки, в нейרוцити, в базофільні клітини аденогіпофізу та в клітини пухкої сполучної тканини (фібробласти). Клітини пухкої сполучної тканини активно синтезують ейкозаноїди, тому їм необхідний постійний приплив ПНЖК, що здійснюється регульованим через апоВ-100 рецептор поглинанням ЛПНЩ, які несуть зазначені кислоти в складі ефірів холестеролу. Фермент **циклооксигеназа**, що утворює ейкозаноїди, пригнічується саліцилатами, які успішно застосовуються в кардіології (для пригнічення тромбоутворення), при лихоманці (як жарознижуючий засіб за рахунок розширення судин шкіри і підвищення тепловіддачі). Однак одним з серйозних побічних ефектів саліцилатів є пригнічення синтезу простагландинів в нирках і зниження ниркового кровообігу.

ЛПНЩ утворюються в гепатоцитах і в судинній системі печінки de novo під впливом печінкової ТАГ-ліпази з ЛПДНЩ. Вони характеризуються:

- середні розміри – 0,02 мкм
- в складі переважають холестерол і його ефіри, іншу половину маси ділять білки і фосфоліпіди (43% вільного ХС і його ефірів, 25% білки, 22% фосфоліпідів, 10% триацилгліцеролів)
- основним апобілком є апоВ-100
- найбільш атерогенні.

Особливістю клітин, що поглинають ЛПНЩ, є наявність лізосомальних кислих гідролаз, які розщеплюють ефіри ХС. В інших клітинах таких ферментів немає.

В плазмі крові первинні ЛПНЩ взаємодіють з ЛПВЩ, віддаючи вільний ХС і отримуючи етерифікований. В результаті в них відбувається накопичення ефірів ХС, збільшення гідрофобного ядра і «виштовхування» білка апоВ-100 на поверхню частинки. Таким чином, первинні ЛПНЩ трансформуються в зрілі.

На всіх клітинах, що використовують ЛПНЩ, є специфічні до них високоафінні рецептори – апоВ-100-рецептори. Близько 50% ЛПНЩ взаємодіє з апоВ-100-рецепторами різних тканин і приблизно стільки ж поглинається гепатоцитами. На кількість апоВ-100-рецепторів впливають гормони: інсулін, тиреоїдні та статеві гормони стимулюють їх синтез, а глюкокортикоїди зменшують кількість рецепторів.

При взаємодії ЛПНЩ з рецептором відбувається ендоцитоз ліпопротеїну і його лізосомальний розпад на складові частини – фосфоліпіди, білки (з наступним їх гідролізом далі до амінокислот), гліцерин, вищі жирні кислоти, холестерол і його ефіри. Після цього ХС метаболізується за одним із зазначених вище шляхів (синтез глюкокортикоїдів і мінералокортикоїдів – кора надниркових залоз, статевих гормонів – статеві залози, холекальциферолу – шкіра чи утилізація ХС в печінці з утворенням жовчних кислот) або включається до складу мембран; надлишки мембранного ХС видалюються за допомогою ЛПВЩ, а принесені з ефірами ХС ПНЖК використовуються для синтезу ейкозаноїдів або фосфоліпідів. При неможливості видалити весь надлишковий ХС частина його

етерифікується з олеїною або лінолевою кислотами ферментом *ацил-S-КоА-холестерол-ацилтранс-феразою* (АХАТ-реакція).

Підвищений вміст в плазмі ЛПНЩ чітко пов'язаний з розвитком коронарного, каротидного і периферійного *атеросклерозу*. Однак, для того щоб ЛПНЩ стали атерогенними, вони повинні модифікуватися. Причиною модифікації найчастіше служить процес перекисного окиснення ЛПНЩ. Модифіковані ЛПНЩ змінюють свої властивості в двох напрямках: порушується їх взаємодія з рецепторами печінки (ендоцитоз), та вони стають активними хемоатрактантами (подразниками) для клітин-скевенджерів (в першу чергу, моноцитів та інших фагоцитуючих клітин). Активовані моноцити крові проникають в субендотеліальний шар, трансформуються в макрофаги, фагоцитують модифіковані ЛПНЩ і перетворюються в «пінисті» клітини (переповнені естерами ХС). Макрофаги і пінисті клітини вивільняють біологічно активні речовини: фактори росту, прозапальні цитокіни, молекули адгезії. В результаті значно підсилюються процеси проникності ендотелію і росту атеросклеротичної бляшки, що в остаточному підсумку веде до звуження просвіту судин чи розриву бляшки з утворенням тромбу.

Ліпопротеїни високої щільності. Їх функції:

1. транспорт вільного ХС від тканин до печінки.
2. транспорт фосфоліпідів, які є джерелом полієнових кислот для синтезу клітинних фосфоліпідів і ейкозаноїдів.

Ліпопротеїни високої щільності утворюються в печінці *de novo*, в плазмі крові при розпаді хіломікронів, деяка кількість в стінці кишечника. Вони характеризуються:

- середні розміри – 0,01 мкм
- в їх складі приблизно половину займають білки, ще чверть фосфоліпіди, а решта – холестерин і ТАГ (50% білка, 30% ФЛ, 2% ТАГ, 18% вільного ХС та його ефірів)
- їх основним апобілком є апо А1, крім того містять апоЕ і апоСІІ.

Виділяють два підкласи ЛПВЩ: ЛПВЩ-2 і ЛПВЩ-3. ЛПВЩ-3 мають дискоїдну форму, і саме вони починають активне захоплення ХС з периферичних клітин і макрофагів, поступово перетворюючись в ЛПВЩ-2 – сферичні частинки, багаті на естери ХС і фосфоліпіди.

Синтезований в печінці ЛПВЩ (насцентний або первинний) містить в основному фосфоліпіди і апобілки. Решта ліпідних компонентів накопичуються в ньому по мірі його метаболізму в плазмі крові. В плазмі крові він спочатку перетворюється в ЛПВЩ-3 (умовно його можна назвати «зрілий»). При цьому головним є те, що ЛПВЩ забирає від клітинних мембран вільний ХС при безпосередньому контакті або за участю специфічних транспортних білків, віддає їм частину своєї фосфоліпідної оболонки, доставляючи таким чином полієнові жирні кислоти в клітини, а також тісно взаємодіє з ЛПНЩ і ЛПДНЩ, отримуючи вільний холестерол і від них. Взамін цього, ЛПВЩ-3 віддають їм ефіри ХС, утворені завдяки перенесенню жирної кислоти від фосфатиділхоліну на холестерин за участю *лецитин-холестерол-ацилтрансферази* (ЛХАТ-реакція). В цій реакції залишок полієнаної кислоти переноситься від фосфатиділхоліну (з оболонки ЛПВЩ) на одержаний вільний холестерин з утворенням лізофосфатиділхоліну (лізоФХ) і ефірів ХС. ЛізоФХ залишається всередині ЛПВЩ, а ефір холестерину відправляється в ЛПНЩ. Крім цього, ЛПВЩ, взаємодіючи з ЛПДНЩ та ХМ, отримують від них ацилгліцероли (МАГ, ДАГ, ТАГ), і обмінюються холестерином і його ефірами, а також віддають апоЕ- і апоСІІ-білки на первинні форми ЛПДНЩ і ХМ та забирають назад апоСІІ-білки від їх залишкових форм.

Таким чином, в ЛПВЩ відбувається накопичення вільного ХС, МАГ, ДАГ, ТАГ, лізо-ФХ і втрата фосфоліпідної оболонки. В результаті первинний ЛПВЩ поступово, через зрілу форму ЛПВЩ-3, перетворюється в ЛПВЩ-2 (залишкова, ремнантна форма). ЛПВЩ-2 захоплюються гепатоцитами за допомогою апоА-1-рецептору і руйнуються.

Характеристика дисліпопротеїнемій

Термін «дисліпопротеїнемія» (чи «дисліпідемія») означає різноманітні зміни спектра ліпопротеїнів плазми крові – підвищення чи зниження їх вмісту, майже повну відсутність окремих фракцій, появу незвичайних чи патологічних фенотипів і т.д. В більш вузькому значенні застосовують терміни «гіперліпопротеїнемія» (для зазначення підвищеного рівня однієї чи декількох фракцій ліпопротеїнів) та «гіперліпідемія», що вказує на підвищення вмісту в плазмі крові ліпідів, серед яких найбільше клінічне значення має збільшення рівня ХС (*гіперхолестеринемія*) та ТАГ (*гіпертригліцеридемія*). Саме вони є найбільш актуальними.

В етіопатогенетичному плані гіперліпідемії – це вроджені або набуті (вторинні) порушення в різних ланках ліпід-транспортних систем організму, наслідком яких є зміни якісного і/або кількісного складу ліпопротеїнів плазми крові. Вони (в залежності від фенотипу дисліпідемії) клінічно проявляються ксантомадозом, ксантелазмами, атеросклерозом

Порівняльна характеристика різних фракцій ліпопротеїнів

Клас ліпопротеїнів	відношення ТАГ/ХС	період напівжиття (год.)	специфічні аполіпопротеїни	щільність (густина) г/мл	середній діаметр, нм
ХМ	ТАГ>>ХС	1-2	A-I, A-II, B-48 C-I, C-II, C-III	<0,95	500
ЛПДНЦ	ТАГ>>ХС	2-4	B-100, E, C-I, C-II, C-III	<1,006	45
ЛППЦ	ТАГ=ХС	15	B-100, E, C-III	1,006-1,019	25
ЛПНЦ	ХС>>ТАГ	24-48	B-100	1,019-1,063	20
ЛПВЦ	ХС>ТАГ	48-120	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E	1,063-1,210	8

Кількісний склад ліпопротеїнів плазми

вміст в %	ХМ	ЛПДНЦ	ЛППЦ	ЛПНЦ	ЛПВЦ
Білок	1	10	14	25	50
Ліпіди	99	90	86	75	50
ТАГ	90	65	28	10	2
фосфоліпіди	4	12	20	22	30
холестерин, в т.ч.	5	13	38	43	18
% ефірів ХС	46	57	66	70	74

різних локалізацій, жировим гепатозом, гепатоспленомегалією, гострим чи хронічним панкреатитом та ін.

На сьогодні існують різні класифікаційні підходи до систематизації гіперліпідемій. Одним з найбільш популярних є підхід, запропонований Фредриксоном, Леві і Лис (1967), що базується на біохімічних фенотипічних ознаках гіперліпідемій – результатах визначення рівнів загального холестерину і тригліцеридів за допомогою

електрофорезу та ультрацентрифугування ліпопротеїдів плазми. При цьому, патологічними рахуються рівні загального холестерину і тригліцеридів, які перевищують 90-й перцентиль серед населення.

Біохімічна фенотипічна класифікація гіперліпопротеїнемій (на основі Fredrickson), рекомендована ВООЗ, представлена в таблиці нижче. Не дивлячись на те, що при її клінічному застосуванні іноді виникають певні труднощі (в основному онтологічного характеру), вона в цілому дозволяє оцінити потенційну атерогенність гіперліпідемії незалежно від її етіології.

Фенотипічна класифікація гіперліпопротеїнемій (ВООЗ)

Тип	надлишок ліпопротеїнів	ТАГ	холестерин плазми	атерогенність	частота
I	ХМ	дуже високі	норма	неатерогенний	<1
II a	ЛПНЩ	норма	значно підвищений	висока	10
II b	ЛПНЩ і ЛПДНЩ	підвищені	підвищений	висока	40
III	ремнанти ХМ і ЛППЩ	значно підвищені	підвищений	висока	<1
IV	ЛПДНЩ	підвищені	норма	помірна	45
V	ХМ і ЛПДНЩ	дуже високі	норма	низька	5

Гіперліпопротеїнемія I типу характеризується гіперхіломікронемією і, відповідно, гіпертригліцеридемією, які виникають внаслідок дефіциту (чи зниження активності) ліпопротеїніпази або дефекту її білка-активатора – апо С II.

Гіперліпопротеїнемія типу II a – це гіпер- β -ліпопротеїнемія з підвищеним вмістом ХС (гіперхолестеринемія) в плазмі крові. Ця гіперліпідемія може бути спорадичною (в результаті неправильного харчування), полігенною або спадковою. Спадкова гіперліпопротеїнемія IIa типу розвивається в результаті мутації гена ЛПНЩ-рецептора або гена апо В; проявляється ксантомами та раннім розвитком серцево-судинних захворювань.

Гіперліпопротеїнемія типу II b – гіпер- β -ліпопротеїнемія і гіперпре- β -ліпопротеїнемія зі збільшенням рівня як ХС, так і ТАГ. Головна причина її виникнення – це посилене утворення основного компоненту ЛПДНЩ – тригліцеридів, а також ацетил-КоА і апоВ-100. Більш рідкісною причиною може бути сповільнене видалення ЛПНЩ (внаслідок зниження кількості ЛПНЩ-рецепторів чи їх афінності).

Гіперліпопротеїнемія III типу – це дис- β -ліпопротеїнемія, при якій виявляють так звані *флотуючі* β -ліпопротеїни, що утворюються в результаті неповного метаболічного перетворення ЛПДНЩ в ЛПНЩ (по суті мова йде про порушення утилізації та накопичення ЛППЩ, які в нормі практично не визначаються, оскільки є короткоживучими транзиторними формами); для цього типу характерні гіперхолестеринемія і помірна гіпертригліцеридемія. Найчастіша причина – гомозиготна форма мутацій гену апоЕ, яка характеризується порушенням зв'язування з ЛПНЩ-рецептором.

Гіперліпопротеїнемія IV типу – гіперпре- β -ліпопротеїнемія, що супроводжується гіпертригліцеридемією при нормальному чи помірному підвищенні вмісту ХС в плазмі крові. Головна причина – посилене утворення ЛПДНЩ та їх уповільнений катаболізм.

Гіперліпопротеїнемія V типу – це змішана форма, при якій внаслідок відповідних причин спостерігається поєднання гіперліпопротеїнемій I (гіперхіломікронемії) та IV (гіперпре- β -ліпопротеїнемії) типів, що призводить до вираженої гіпертригліцеридемії і (в деяких випадках) незначної гіперхолестеринемії.

Гіперліпопротеїнемії I, III і V типів в порівнянні з іншими зустрічаються досить рідко (I та V типи – переважно в педіатричній практиці). Гіперліпопротеїнемії IIa, IIb і IV типів, які спостерігаються у дорослих, зазвичай, легко диференціюються за рівнем ХС і ТАГ, хоча в ряді випадків точно встановити тип гіперліпопротеїнемії лише за рівнем ліпідів не вдається, і тоді застосовують складніші (спеціальні) методи їх типування.

Гіпер-альфа-ліпопротеїнемія (хвороба Норум) характеризується збільшенням вмісту в крові ЛПВЩ і холестерину і може бути віднесена до патологій лише умовно, так як ЛПВЩ не проявляють атерогенних властивостей; не потребує лікування, якщо не є вторинною. Виділяють сімейну форму хвороби, яка характеризується виразним підвищенням рівня ЛПВЩ при нормальному вмісті інших ліпідів. Рівень загального холестерину, як правило, знаходиться в межах 5,2-6,4 ммоль/л. При цьому немає клінічних проявів і не буває ускладнень, а тривалість життя у осіб з цим порушенням частіше збільшена. Генетичні дослідження показали, що сімейна гіпер-альфа-ліпопротеїнемія успадковується як аутосомно-домінантна ознака з повною пенетрантністю. Частота цього стану, ймовірно, перевищує 1: 3000.

До станів, при яких спостерігається зниження рівня ЛПВЩ в крові, відносяться атеросклероз, ішемічна хвороба серця, ожиріння, холестаза, хронічні захворювання печінки, цукровий діабет, нефротичний синдром, хронічна ниркова недостатність, хвороба острова Танжер. Крім того, до зниження ЛПВЩ можуть призводити куріння, прийом деяких лікарських препаратів (бета-блокатори, інтерферон, діуретики, прогестини, андрогени), багатий вуглеводами раціон харчування і ін.

Гіпо-альфа-ліпопротеїнемія (хвороба острова Танжер) – рідкісне порушення метаболізму ліпопротеїдів, яке біохімічно характеризується практично повною відсутністю в плазмі ЛПВЩ, а клінічно – гепатоспленомегалією та збільшенням лімфатичних вузлів і мигдалин (накопичення ефірів холестерину в клітинах RES цих органів і мононуклеарних фагоцитах), яскравим жовто-оранжевим кольором мигдалин та слизових ШКТ (патогномонічна ознака), периферичною нейропатією у дітей і підлітків, а іноді – захворюваннями серцево-судинної системи у дорослих. Її причина – мутації гена ABC1, кодуючого ATP-binding cassette transporter 1, – білок, який регулює транспорт холестерину, орієнтуючи внутрішньоклітинний холестерин в сторону клітинної поверхні і прискорюючи його транспорт в сторону ліпідного ядра ЛПВЩ. Повний прояв хвороби зустрічається у осіб, гомозиготних за цією ознакою. Поширеність невідома: на сьогоднішній день в всьому світі описано близько 100 випадків захворювання. Хвороба отримала своє найменування за назвою острова Танжер біля східного узбережжя Америки, на якому серед нащадків переселенців були виявлені перші хворі.

Відповідно до NCEP (The National Cholesterol Education Program) АТР (Adult Treatment Panel) III перегляду гіперліпідемія розглядається як патологічний стан, коли концентрації основних компонентів ліпідного спектру плазми виходять за межі встановленого інтервалу референтних значень, а саме:

для ТАГ – > 200 мг/дл (2,26 ммоль/л)

для загального ХС – > 240 мг/дл (6,21 ммоль/л)

для ХС ЛПНГ – > 130 мг/дл (3,36 ммоль/л)

для ХС ЛПВЩ – < 35 мг/дл (0,91 ммоль/л).

Клінічна класифікація первинних дисліпідемій

Українського наукового товариства кардіологів

Дисліпідемії	Підвищення в плазмі концентрації	
	ліпопротеїнів	ліпідів
Гіперхолестеринемія: • сімейна (моногенна) • набута (полігенна)	ЛПНЩ	холестерин
Дисліпідемії	Підвищення в плазмі концентрації	
	ліпопротеїнів	ліпідів
Комбінована (змішана) дисліпідемія • сімейна • набута	ЛПНЩ і ЛПДНЩ	холестерин та ТАГ
Ремнантна дисліпідемія (дисбеталіпопротеїнемія)	ЛППП	холестерин та ТАГ
Гіпертригліцеридемія: • сімейна ендегенна • набута	ЛПДНЩ	ТАГ
Важка гіпертригліцеридемія: (сімейна гіперхіломікронемія) • тип I • тип V	ХМ ХМ і ЛПДНЩ	ТАГ ТАГ
Ізольоване зниження рівня холестерину ЛПВЩ	Зниження холестерину ЛПВЩ (за відсутності істотних змін рівнів ХС ЛПНЩ та ТАГ): • для чоловіків <1,0 ммоль/л (40 мг/дл) • для жінок <1,3 ммоль/л (50 мг/дл).	

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ

5.1 ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Класифікація ліпопротеїдів плазми крові за методом розділення (центрифугування, електрофорез)
2. Порівняльна оцінка вмісту холестерину та його ефірів у різних класах ліпопротеїдів
3. Ліпопротеїди високої щільності (ЛПВЩ) – локалізація, утворення фракції в організмі. Механізм перетворення насцентних ЛПВЩ у ремнантну форму, функція у крові. Антиатерогенні властивості ЛПВЩ.
4. Гіпер- і гіпо- α -ліпопротеїдемії. Зміни вмісту холестерину та ЛПВЩ у крові пацієнтів при атеросклеротичному ураженні судин
5. Ліпопротеїни низької та дуже низької щільності (ЛПНЩ, ЛПДНЩ): локалізація утворення фракцій в організмі, механізм перетворення насцентної форми в ремнантну, функція в крові. Атерогенні властивості ЛПНЩ
6. Ліпопротеїни плазми крові в діагностиці порушень обміну ліпідів
7. Первинні та вторинні гіперліпопротеїнемії. Зміна вмісту холестерину та ЛПНЩ в крові пацієнтів при атеросклеротичному ураженні судин

5.2 ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 6

Дата

1. Визначення загального холестерину ферментативним методом

Принцип методу: Холестерин сироватки крові під дією холестерин оксидази окислюється киснем повітря до холестен-3-ону та перекису водню. Останній під дією пероксидази утворює з фенолом та 4-аміноантипірином хінонімін рожево-черво-ного кольору. Інтенсивність забарвлення розчину прямо пропорційна концентрації холестерину у крові.

Лінійність методу: 0,05 – 19,4 ммоль/л

Нормальні значення: 3,88 – 6,72 ммоль/л

Концентрація холестерину стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реанти:

- 1) ФЕК: довжина хвилі 540 нм; довжина оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) Реактив 1 (розчин ферменту)
- 6) Стандартний розчин холестерину

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти у пробірці:	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуванний матеріал	0,02 мл	--	--
Стандартний розчин	--	0,02 мл	--
Фізіол. розчин	--	--	0,02 мл
Реактив 1	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25°С протягом 20 хв. або 10 хв. при температурі 37°С. Виміряти оптичну щільність дослідної і стандартної проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 60 хвилин.

Розрахунок

Вміст холестерину у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом по формулі:

$$C_{\text{дос}} (\text{ммоль/л}) = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де $C_{\text{дос}}$ – концентрація холестерину у досліджуваній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартної проби;

$C_{\text{ст}}$ – концентрація холестерину в стандартному розчині

При вмісті холестерину в дослідній пробі понад 19,4 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести фізіологічним розчином і

повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на коефіцієнт розведення.

Клініко-діагностичне значення.

Холестерин може накопичуватися у крові у великих кількостях при порушеннях ліпідного обміну. Тривала гіперхолестеринемія за умови зниженої розчинності холестерину призводить до розвитку атеросклерозу внаслідок відкладення у стінках артерій переважно зв'язаного холестерину з наступним утворенням атеро-матозних бляшок. Збільшення концентрації холестерину відмічається також при механічній жовтяниці, нефриті, нефрозах, що супроводжуються набряком, гіпотиреозі, цукровому діабеті. Зниження вмісту холестерину спостерігається при анеміях, туберкульозі, лихоманках, гіпертиреозі, паренхіматозній жовтяниці, раковій кахексії, голодуванні.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Е досл.	Абсолютне значення

Висновок:

2. Визначення холестерину в ліпопротеїдах високої щільності прямим методом

Принцип методу: Антитіла до β -ліпопротеїдів, що містяться у реагенті 1, утворюють імунний комплекс з усіма ліпопротеїдами, окрім ЛПВЩ. Утворення імунних комплексів блокує участь зв'язаних ліпопротеїдів у реакції з реактивом 2. Холестериноксидаза та холестеринестераза з реагенту 2 окислюють тільки ЛПВЩ.

Лінійність методу: 0,05–19,4 ммоль/л

Нормальні значення: 3,88–6,72 ммоль/л

Концентрація холестерину ЛПВЩ стабільна протягом 24 годин при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма відібрані не пізніше 30 хвилин після забору крові.

Обладнання і реагенти:

- 1) ФЕК: довжина хвилі 540 нм та довжина оптичного шляху 10 або 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,02, 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) Реактив 1 (розчин ферменту)
- 6) Стандартний розчин холестерину.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти у пробірку:	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Досліджуваний матеріал	0,02 мл	--	--
Стандартний розчин	--	0,02 мл	--
Фізіол. розчин	--	--	0,02 мл
Реактив 1	2,0 мл	2,0 мл	2,0 мл

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 20 хв. або 10 хв. при температурі 37⁰С. Виміряти оптичну щільність дослідної (E_{дос}) і стандартної (E_{каліб}) проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм. Забарвлення розчину стабільне протягом 60 хвилин.

Розрахунок

Вміст холестерину ЛПВЩ у досліджуваному матеріалі розраховують за стандартом по формулі:

$$C_{\text{дос}} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де C_{дос} – концентрація холестерину у досліджуваній пробі, ммоль/л;

E_{дос} – оптична щільність дослідної проби;

E_{ст} – оптична щільність стандартної проби;

C_{ст} – концентрація холестерину в стандартному розчині

При вмісті холестерину в дослідній пробі понад 19,4 ммоль/л (поза зоною лінійності методу), аналізовану рідину слід розвести фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на коефіцієнт розведення.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	E досл.	Абсолютне значення

Висновок:

Клініко-діагностичне значення.

Зменшення вмісту α-ліпопротеїнів спостерігається при гострих гепатитах, цирозах печінки та застійних жовтяницях. Збільшення рівня α-ліпопротеїнів інколи спостерігається при хронічному гепатиті.

3. Визначення холестерину в ліпопротеїдах низької щільності турбідиметричним методом

Принцип методу: В присутності хлориду кальцію та гепарину порушується колоїдна стійкість білків сироватки крові, у зв'язку з чим в осад випадають тільки β -ліпопротеїни. При цьому гепарин утворює з β -ліпопротеїнами комплекс, який під дією хлористого кальцію випадає в осад. За ступенем каламутності визначають вміст β -ліпопротеїнів у сироватці крові.

Нормальні значення: 0,35-0,55 оптичних одиниць (35-55 умовних одиниць).

Концентрація β -ліпопротеїнів стабільна протягом 24 годин при температурі $+2 - +8^{\circ}\text{C}$.

Обладнання і реагенти:

- 1) ФЕК: довжин хвилі 720 нм; довжина оптичного шляху 5 мм
- 2) Автоматичні або скляні піпетки на 0,04, 0,2 і 2 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Фізіологічний розчин
- 5) 0,28% розчин хлориду кальцію. Розчин готують шляхом додавання до 1 мл 10% розчину хлориду кальцію 17 мл дистильованої води.
- 6) Розчин гепарину активністю 1000 одиниць в 1 мл

Проведення аналізу

В праву та ліву кювети фотоколориметра вносять по 2 мл 0,28% розчину хлориду кальцію і виставляють нульову точку при червоному світофільтрі. Потім в праву кювету приливають 0,2 мл сироватки та після перемішування скляною паличкою вимірюють оптичну щільність, яка звичайно складає 0,01-0,03. Потім в цю ж кювету додають 0,04 мл розчину гепарину, перемішують паличкою й засікають час секундоміром. Через 4 хв. повторно вимірюють оптичну щільність вмісту кювети.

Розрахунок

Результат виражають в одиницях оптичної щільності: $E = E_2 - E_1$, або в умовних одиницях: $E = (E_2 - E_1)$, де E_1 – оптична щільність розчину перед додаванням розчину гепарину, E_2 – оптична щільність розчину через 4 хвилини після додавання розчину гепарину.

Клініко-діагностичне значення.

Збільшення вмісту β -ліпопротеїнів – патологія, що найчастіше зустрічається при дослідженні ліпідограми. Вона супроводжує атеросклероз, інтрагепатальний застій жовчі, механічній жовтяниці, діабеті, гіпотиреозі, мононуклеозі, β_1 -плазмоцитомі. Зменшення β -ліпопротеїнової фракції відмічається при β_2 -плазмоцитомі.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	E досл.	Абсолютне значення

Висновок:

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім виконання описаних робіт, проводиться визначення загального холестерину та його фракцій на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які показники ліпідного обміну необхідно визначити для розрахунку вмісту ЛПНЩ по формулі?

- A. Загальні ліпіди
- B. Загальний холестерин, ТГ
- C. Фосфоліпіди
- D. Загальний холестерин, ТГ, ХС-ЛПВЩ
- E. Тригліцериди та фосфоліпіди

2. Що таке дисліпопротеїдемія?

- A. Гіпохолестеринемія або гіпертригліцеридемія або і те й інше разом
- B. Підвищення вмісту в плазмі одного або декількох класів ліпопротеїдів
- C. Збільшення ХС і ЛПДНЩ у плазмі крові
- D. Порушення кількісного співвідношення ЛП у плазмі крові
- E. Підвищення вмісту загальних ліпідів у сироватці крові

3. Який клас ліпопротеїдів містить найбільшу кількість холестерину?

- A. Хіломікрони
- B. Бета-ліпопротеїди (ЛПНЩ)
- C. Альфа-ліпопротеїди (ЛПВЩ)
- D. Пре-бета-ліпопротеїди (ЛПДНЩ)
- E. Ліпопротеїни проміжної щільності (ЛППЩ)

4. Вміст якого класу ліпопротеїдів в крові залежить від функції статевих гормонів, естрогенів?

- A. ЛПДНЩ
- B. ЛПНЩ
- C. ЛПВЩ
- D. Хіломікронів
- E. Всі відповіді правильні

5. Назвіть принцип турбідиметричного методу визначення β - і пре- β -ЛП:

- A. β - і пре- β -ліпротеїди утворюють нерозчинні комплекси з іоном Ca^{+2}
- B. β - і пре- β -ліпротеїди осаджуються гепарином в присутності іонів кальцію, утворюючи нерозчинні комплекси
- C. Бета- і альфа-ліпротеїди утворюють комплекси з гепарином
- D. Бета-ліпопротеїди утворюють комплекси з гепарином
- E. Альфа-ліпротеїди утворюють комплекси з гепарином

6. Який тип гіперліпопротеїдемії варто встановити, якщо плазма злегка каламутна, вміст ліпопротеїдів збільшений за рахунок бета- і пребета- ЛП , збільшена концентрація ХС, ТГ?

- A. II б
- B. II а
- C. IV

- D. I
E. V
- 7. Які фракції ліпопротеїдів є антиатерогенними?**
A. ЛПДНЩ
B. ЛПНЩ
C. ЛПВЩ
D. Хіломікрони
E. Всі відповіді правильні
- 8. При яких захворюваннях виявляється IV тип гіперліпопротеїдемій?**
A. Цукровому діабеті, ожирінні
B. Ішемічної хвороби серця
C. Нефротичному синдромі
D. Гіпотиреозі
E. Всі відповіді правильні
- 9. Зменшення якого класу ЛП плазми розглядається як ознака розвитку атеросклерозу:**
A. ЛПДНЩ
B. ЛПНЩ
C. ЛПВЩ (альфа-ліпопротеїдів)
D. Хіломікрони
E. Хіломікрони і ЛПНЩ
- 10. Яка зміна показників ліпідного обміну (ТГ, ХС, ФЛ, Бета-ЛП) відзначається при легкій формі вірусного гепатиту?**
A. Близьке до норми
B. Знижене
C. Помірно підвищене
D. Різко підвищене
E. Різко знижене
- 7. ЛІТЕРАТУРА** (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 7

1. ТЕМА: Підсумкове заняття зі змістовного модулю 1

2. МЕТА:

Перевірити засвоєння тем занять з питань теоретичної частини і завдання, які пов'язані з темами лабораторних робіт

ЗАНЯТТЯ № 8

1. ТЕМА: Загальний білок та його фракційний склад. Транспортні білки та інгібітори протеолізу. Білки гострої фази

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Вивчення функцій, хімічного складу крові у нормі та при патологічних станах має велике значення для розуміння її ролі у координації взаємодії процесів метаболізму у різних органах та об'єднання їх у єдину систему.

Аналіз основних фракцій білків плазми та сироватки крові відіграє важливу роль для корекції їх порушень.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичний матеріал стосовно загального білку крові та його фракційного складу. Вміти визначити загальний білок та альбумін в сироватці крові, а також засвоїти основні типи протеїнограм.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Білки запасуються в організмі в дуже обмежених кількостях. Короткотривалий резерв білка складає всього 45 г (40 г у м'язах, 5 г – у крові та печінці).

При абсолютно безбілковій дієті, яка повністю задовільняє потреби організму в енергії(!) за рахунок інших компонентів, втрата білка в результаті катаболізму при вазі людини 70 кг складає 23,2 г/добу. Поповнення його в такій кількості є мінімально необхідним та носить назву **абсолютний білковий мінімум** чи **коефіцієнт зношування**. Оскільки абсолютно ідеальних за якісним та кількісним амінокислотним складом білків не існує, то для забезпечення білкового балансу (покриття абсолютного білкового мінімуму) людині при змішаній дієті необхідно 30-40 г білка на добу.

Якісний і кількісний амінокислотний склад визначає **біологічну цінність білка** – показник, який вказує кількість білків організму, що може ресинтезуватись при вживанні 100 г певного харчового білка. Він складає 80-100 г для тваринних білків та 60-70 г – для рослинних.

Добова потребність білка – 1 г/кг (у дітей та вагітних – 1,5-2 г /кг).

Для оцінки обміну білків визначається **азотистий баланс** – відношення сумарного азоту, який надійшов в організм та утворився в ньому, до виведеного з організму. Показником нормального білкового обміну є азотиста рівновага та позитивний азотистий баланс. Негативний азотистий баланс – ознака патології.

В плазмі крові міститься декілька десятків різних білків, які відрізняються за фізико-хімічними та функціональними властивостями: ферменти, інгібітори ферментів, транспортні білки, гострофазові реагенти, гормони, антитіла, антитоксини, фактори коагуляції та антикоагулянти тощо. Загальна концентрація білків у плазмі крові людини становить 65-85 г/л.

Основні функції білків плазми:

1. Білки підтримують колоїдно-осмотичний (онкотичний) тиск, а, отже, постійний об'єм крові. Вони зв'язують воду і затримують її, не дозволяючи виходити за межі кров'яного русла.

2. Білки плазми беруть активну участь у згортанні крові. Низка білків крові, у тому числі фібриноген, є основними компонентами системи згортання крові.

3. Білки плазми певною мірою визначають в'язкість крові, яка в 4-5 разів перевищує в'язкість води і відіграє важливу роль у підтриманні гемодинаміки кровоносної системи.

4. Білки плазми, формуючи білкову буферну систему, беруть участь у підтриманні рН крові в межах 7,36-7,43.

5. Транспортна функція білків плазми крові полягає в перенесенні ними низки речовин (холестерин, білірубін тощо), а також лікарських засобів (пеніцилін, саліцилати тощо).

6. Білки плазми крові відіграють важливу роль в процесах імунітету (імуноглобуліни).

7. В результаті утворення комплексів з білками плазми на належному рівні підтримується катіонний склад крові: наприклад, 40-50 % кальцію, залізо, магній та інші елементи сироватки крові зв'язані з білками.

8. Білки крові є резервом амінокислот.

При електрофорезі на папері виділяється п'ять фракцій білків плазми крові: альбуміни (55-65%), α_1 -глобуліни (2-4%), α_2 -глобуліни (6-12%), β -глобуліни (8-12%) та γ -

глобуліни (12-22%). Електрофорез в поліакриламідному чи крохмалевому гелі дозволяє виділити 16-17 білкових фракцій, а метод імуоелектрофорезу – 30.

Альбуміни синтезуються в печінці, їх концентрація в плазмі крові становить 40-50 г/л. Цей білок складається з 585 амінокислотних залишків, має 17 дисульфідних зв'язків, його молекулярна маса – 69000 да. Завдяки наявності в складі їх молекул великої кількості дикарбонових амінокислот вони є поліаніонами і тому можуть утримувати катіони Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Ця фракція білків характеризується високою електрофоретичною рухливістю та високою розчинністю у воді і сольових розчинах. За рахунок високої гідрофільності альбуміни зв'язують значну кількість води, і об'єм їх молекули за умов гідратації збільшується вдвічі. Гідратаційний шар, який утворюється навколо молекул сироваткових альбумінів, забезпечує до 70-80 % онкотичного тиску білків плазми крові, що застосовується в клінічній практиці при переливанні розчинів альбуміну хворим із тканинними набряками. В свою чергу, зменшення концентрації альбумінів сироватки, наприклад за умов порушення їх синтезу в гепатоцитах при печінковій недостатності, може спричинити перехід води із судинного русла до тканин і розвиток онкотичних набряків.

Альбуміни виконують також важливу фізіологічну функцію як транспортери багатьох метаболітів та інших низькомолекулярних сполук. вони переносять вільні жирні кислоти, некон'югований білірубін, триптофан, тироксин, аспірин, дикумарол, сульфаніл-аміди тощо.

Транстиретин (преальбумін) називають ще тироксинзв'язувальним преальбуміном. Це білок гострої фази, має тетрамірну молекулу. Він може приєднувати в одному центрі зв'язування ретинол, а в другому – до двох молекул тироксину та трийодтироніну.

Глобуліни – гетерогенна фракція глікопротеїнів крові, які виконують транспортні та захисні функції.

Транспорт ендогенних метаболітів і вітамінів глобулінами плазми крові

Фракція глобулінів	Білок-транспортер	Транспорт	
		ендогенних метаболітів	вітамінів
α_1	транскортин, транскобальмін, ретинол- та тироксинзв'язувальний	тироксин, кортизол, ліпіди	
α_2	церулоплазмін, гаптоглобін, ліпопротеїни	гемоглобін, жири,, холестерин, фосфатиди Ca^{2+} , Cu^{+}	D, K, E
β	трансферин	Fe^{3+}	

В клінічній практиці застосовується визначення співвідношення між концентрацією альбумінів і глобулінів у плазмі крові (так званого "білкового коефіцієнта"), який становить в середньому 1,5 - 2,0.

α_1 -антитрипсин (α_1 -протеїназний інгібітор) – глікопротеїн з молекулярною масою 55 кД, належить до α_1 -глобулінів, його концентрація в плазмі крові становить 2-3 г/л. Основною біологічною властивістю цього інгібітора є його здатність утворювати комплекси з протеїназами, пригнічуючи при цьому протеолітичну активність таких ферментів, як трипсин, хімотрипсин, плазмін, тромбін та протеаз, які вивільняються при руйнуванні лейкоцитів або чужорідних клітин у вогнищах запалення. В умовах запального процесу вміст α_1 -антитрипсину в крові значно збільшується за рахунок стимуляції його синтезу в гепатоцитах. оскільки за умов норми цей білок інгібує еластазу, яка руйнує

еластин альвеол легенів, то при його недостатності може виникнути емфізема легенів, а також гепатит.

α_2 -макроглобулін – глікопротеїн α_2 -глобулінової фракції з молекулярною масою 725 кДа. Універсальний сироватковий інгібітор протеїназ, вміст якого в крові найвищий порівняно з іншими протеїназними інгібіторами, і становить в середньому 2,5 г/л. α_2 -макроглобулін знижує активність згор-тальної, фібринолітичної та калікреїнової системи крові, слугує також транспортером цинку в плазмі крові, а також може руйнувати низькомолекулярні токсичні пептиди бактеріального походження.

Церулоплазмін – глікопротеїн α_2 -глобулінової фракції, який зв'язує в плазмі крові іони міді. Молекула церулоплазміну містить по 8 іонів Cu^+ та Cu^{2+} , його молекулярна маса – біля 150 кДа.

До складу церулоплазміну входить до 3% всього вмісту міді в організмі та більше 90% міді плазми. Церулоплазмін має властивості мідьвмісної фероксидази, окиснюючи залізо з феро- (Fe^{2+}) до фери- (Fe^{3+}) форми. Ця реакція є необхідною для перетворення заліза на форму, яка може зв'язуватися феритином і використовуватися для синтезу залізо-вмісних білків (гемоглобіну, цитохромів).

Зниження вмісту церулоплазміну в плазмі крові (*хвороба Вільсона*) (норма 0,15-0,5 г/л) призводить до виходу іонів міді з судинного русла і його накопичення протеогліканами сполучної тканини, що проявляється патологічними змінами в печінці, головному мозку (гепатоцеребральна дегенерація), рогівці тощо. Підвищений рівень цього протеїну спостерігається у вагітних і жінок, що вживають оральні контрацептивні препарати.

Гаптоглобін – білок α_2 -глобулінової фракції плазми крові. Він має здатність зв'язувати вільний гемоглобін, утворюючи комплекс, що входить до електрофоретичної фракції β -глобулінів. Нормальна концентрація в плазмі крові – 0,10-0,35 г/л.

В складі гаптоглобін-гемоглобінового комплексу гемоглобін поглинається клітинами ретикулоендотеліальної системи, зокрема в печінці, та підлягає окисненню до жовчаних пігментів. Така функція гаптоглобіну сприяє збереженню в організмі за умов фізіологічного та патологічного розпаду еритроцитів іонів заліза, що входять до складу гемоглобіну. Цей білок належить до білків гострої фази, його концентрація зростає при гострих запальних процесах.

Трансферин (сидерофілін) – глікопротеїн β -глобулінової фракції, його молекулярна маса – 80 кДа. Білок має на своїй поверхні два центри зв'язування заліза, яке вступає в комплекс із трансферином разом з аніоном гідрокарбонату. Трансферин акцептує іони Fe^{3+} , що надходять у кров після їх всмоктування в кишці, передає його на тканинний *феритин*, у складі якого залізо депонується в печінці, селезінці, кістковому мозку та інших органах. Концентрація трансферину в плазмі крові – близько 4 г/л.

Фібронектин – глікопротеїн β -глобулінової фракції, який синтезується та секретується в міжклітинний простір багатьма клітинами (в нормі його концентрація не перевищує 4 г/л). Фібронектин присутній на поверхні клітин, на базальних мембранах, в сполучній тканині та в крові. Він має властивості "липкого" білка, що зв'язується з вуглеводними компонентами сіалогліколіпідів (гангліозидів) на поверхні плазматичних мембран, виконуючи інтегруючу функцію у міжклітинній взаємодії. Крім цього, за рахунок утворення комплексів з колагеновими фібрилами, фібронектин відіграє значну роль в організації перичелюлярного матриксу. Фібронектин – білок зсідання крові, індикатор запальних станів.

C-реактивний білок (C-реактивний протеїн, СРП) – білок, що отримав свою назву внаслідок здатності реагувати з C-полісахаридом пневмокока, утворюючи при цьому преципітати. За хімічною природою є глікопротеїном. В сироватці крові здорової людини C-реактивний білок відсутній, та з'являється при патологічних станах, що супроводжуються запаленням і некрозом тканин, активуючи систему комплементу. Наявність СРП характерна для гострого періоду захворювань – "білок гострої фази".

Визначення СРП має особливе діагностичне значення в гострій фазі ревматизму, при інфаркті міокарда, пневмококових, стрептококових, стафілококових інфекціях.

Імуноглобуліни крові (IgA, IgG, IgE, IgM, IgD) – білки γ -глобулінової фракції плазми крові, виконуючі функцію *антитіл*, основних ефекторів гуморального імунітету.

Кріоглобулін – білок γ -глобулінової фракції, який, подібно до С-реактивного протеїну, відсутній в плазмі крові здорових людей і з'являється в ній при лейкозах, лімфосаркомі, мієломі, ревматизмі, цирозі печінки, нефрозах. Характерною фізико-хімічною ознакою кріоглобуліну є його розчинність при нормальній температурі тіла (37°C) та здатність утворювати желеподібні осади при охолодженні плазми крові до 4°C.

В клінічній практиці виділяють 10 основних типів **протеїнограм**, які відповідають різним патологічним станам. Типові електрофореграми з характерними змінами вмісту (співвідношення) білкових фракцій представлені в нижче наведеній таблиці.

Тип протеїнограми	Альбуміни	Фракції глобулінів			
		α_1	α_2	β	γ
Гострі запалення	↓↓	↑	↑	—	—
Хронічні запалення	↓	—	↑↑	—	↑↑
Нефротичний синдром	↓↓	—	↑	↑	↓
Злоякісні пухлини	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Гепатити	↓	—	—	↑	↑↑
Некроз печінки	↓↓	—	↓	↑	↑↑
Механічні жовтяниці	↓	—	↑	↑	↑
α_2 -глобулінові плазмоцитомі	↓	↓	↑↑	↓	↓
β -глобулінові плазмоцитомі	↓	↓	↓	↑↑	↓
γ -глобулінові плазмоцитомі	↓	↓	↓	↓	↑↑

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Біохімічні функції крові в організмі людини. Порівняльна характеристика хімічного складу плазми та сироватки крові в нормі.
2. Основні фракції білків плазми та сироватки крові (альбуміни, α -, β -, γ -глобуліни): клініко-біохімічна характеристика, зміна вмісту при патологіях. Типові протеїнограми.
3. Поняття про гіпо-, гіпер-, пара- і диспротеїнемії.
4. Клініко-біохімічна характеристика транспортних білків, білків гострої фази та інгібіторів протеолізу.

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 8

Дата:

1. Кількісне визначення загального білка в сироватці крові біуретовим методом

Принцип методу: Іони міді в лужному середовищі реагують з білком з утворенням

комплексу фіолетового кольору. Оптична щільність комплексу, що утворюється, прямо пропорційна вмісту білка в пробі.

Лінійність методу: 10–150 г/л.

Обладнання і реagentи:

1. ФЕК: довжина хвилі 540 нм; довжина оптичного шляху 1 см
2. Автоматичні або скляні піпетки на 0,1 і 5 мл
3. Сироватка крові
4. Фізіологічний розчин
5. Реagent (гідроксид натрію – 600 ммоль/л, калій-натрій тартрат – 32 ммоль/л, сульфат міді – 12 ммоль/л, йодидкалію – 30 ммоль/л)
6. Калібратор – калібрувальний розчин загального білка, 80,0 г/л

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти в пробірці, мл:	Холоста проба	Калібрувальна проба	Дослідна проба
Калібратор	--	0,1	--
Сироватка	--	--	0,1
Реagent	5	5	5

Ретельно перемішати вміст пробірок та інкубувати при температурі 25⁰С протягом 10 хвилин. Виміряти оптичну щільність дослідної і калібрувальної проб проти холостої проби при довжині хвилі 540 нм.

Забарвлення розчину стабільне протягом 30 хвилин.

Гемоліз і ліпемія впливають на результат, тому для таких проб аналіз слід виконувати з бланком по пробі (20 мкл сироватки змішати з 1 мл фізіологічного розчину). Вимірюється оптична щільність бланка проти фізіологічного розчину і її значення віднімається з оптичної щільності аналізованої проби.

Розрахунок

Вміст загального білка розраховують за калібратором по формулі:

$$ЗБ \text{ (г/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{каліб}}} \times C_{\text{каліб}}$$

де ЗБ – концентрація загального білка в аналізованій пробі, г/л

$E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби

$E_{\text{каліб}}$ – оптична щільність калібрувальної проби

$C_{\text{каліб}}$ – концентрація загального білка в калібраторі

При вмісті загального білка в пробі понад 150 г/л (поза зоною лінійності калібрувального графіка), аналізовану сироватку слід розвести 1:1 фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат помножити на 2.

Заповнити таблицю:

№ п/п	№ зразка	Екстинкція	Абсолютне значення (г/л)
1			
2			
3			
4			

Висновок:***Клініко-діагностичне значення.***

В нормі вміст загального білка складає 65–85 г/л. В клінічній практиці часто зустрічаються стани, що характеризуються змінами вмісту загального білку в сироватці крові. Збільшення його концентрації носить назву гіперпротеїнемії, а зменшення – гіпопротеїнемії. Як гіперпротеїнемія, так і гіпопротеїнемія може бути відносною або абсолютною. ***Відносна гіперпротеїнемія*** пов'язана зі зменшенням вмісту води в організмі (важкі опіки, перитоніт, непрохідність кишечника, тяжка діарея, хронічний нефрит, посилене потовиділення, діабетичний кетоацидоз). ***Абсолютна гіпер-протеїнемія*** зустрічається рідко і пов'язана з синтезом патологічних білків (парапротеїнів), посиленням синтезу імуноглобулінів та білків гострої фази. Вона спостерігається при мієломній хворобі, хворобі Вальденстрема, хворобі Ходжкіна, хронічному поліартриті, активному хронічному гепатиті, аутоімунних захворюваннях, саркоїдозі. ***Відносна гіпопротеїнемія*** пов'язана зі збільшенням об'єму води в кровоносному руслі і спостерігається при анурії, олігурії, порушенні видільної функції нирок та посиленій секреції антидиуретичного гормону гіпоталамусом. ***Абсолютна гіпопротеїнемія*** пов'язана з гіпоальбумінемією та виникає за умов недостатнього надходження білку в організм (голодування, порушення функції шлунково-кишкового тракту), зниження біосинтезу білка (гепатит, цироз печінки, інтоксикація, атрофія печінки), вроджених порушеннях синтезу окремих білків (анальбумінемія, хвороба Вільсона-Коновалова), посиленому розпаді білка (злоякісні новоутворення, тиреотоксикоз), посиленій втраті білка (нефротичний синдром, гломерулонефрит, довготривала діарея, сильні кровотечі). Зменшення вмісту білка може бути обумовлене фізіологічними станами – тривале фізичне навантаження, останній триместр вагітності та період лактації.

В сечі в нормі білок відсутній. Виділення білка з сечею має важливе діагностичне значення. Виділяють преренальну, ренальну та післяренальну протеїнурію. Преренальна протеїнурія обумовлена посиленням процесів розпаду білків (пухлини, опіки, масивний гемолітична анемія). Ренальна протеїнурія пов'язана з патологією нирок (підвищення проникності клубочкового фільтру та зменшенням реабсорбції білка у ниркових канальцях), а післяренальна – з патологією сечовидільних шляхів та ексудацією при запаленні. Поява білка у сечі також може бути обумовлена й іншими факторами – важким фізичним навантаженням, психоемоційним напруженням, підвищенням температури тіла, значним поступанням білків в організм з їжею.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім виконання описаних робіт, проводиться визначення загального білку та його фракцій на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть біологічну функцію, не характерну для крові:

- A. Ферментативна
- B. Енергетична
- C. Транспортна
- D. Дихальна
- E. Регуляторна

2. Укажіть індикаторні ферменти крові:

- A. Аспартатамінотрансфераза
- B. Амідинліаза
- C. Карбоксилаза
- D. L-малатгідроліаза
- E. Фосфатаза

3. Гіпопротеїнемія спостерігається при:

- A. Блювоті
- B. Діареї
- C. Нефротичному синдромі
- D. Опіках
- E. Мієломній хворобі

4. Виберіть сполуки плазми крові, що відіграють головну роль у під-тримці онкотичного тиску крові:

- A. Метгемоглобін
- B. Гемоглобін
- C. Лактат
- D. Жовчні пігменти
- E. Альбуміни

5. Укажіть, зниження вмісту якої білкової фракції плазми крові супроводжується зниженням захисних сил організму:

- A. γ -Глобуліни
- B. Альбуміни
- C. α -Глобуліни
- D. β -Глобуліни
- E. Проламіни

6. Диспротеїнемія – це:

- A. Поява "неспецифічних" білків у крові
- B. Збільшення вмісту загального білку в крові
- C. Зменшення вмісту загального білку в крові
- D. Зміна процентного співвідношення білкових фракцій
- E. Збільшення гемоглобіну в крові

7. Який білок плазми крові з'єднується з гемоглобіном при гемолізі:

- A. Трансферин
- B. Гаптоглобін
- C. Інгібітор трипсину
- D. Інтерферон
- E. Альбуміни

8. Укажіть білок, що з'являється при патологічних станах, які супроводжуються запаленням і некрозом тканин:

- A. Альбуміни

- В. Глобулін
- С. Церулоплазмін
- Д. Трансферин
- Е. С-реактивний білок

9. Укажіть білок, що застосовується при вірусних інфекціях:

- А. Інтерферон
- В. Трансферин
- С. Кріоглобулін
- Д. Трансферин
- Е. С-реактивний білок

10. Укажіть білок крові, що містить у своєму складі мідь:

- А. Фібриноген
- В. Тромбін
- С. Церулоплазмін
- Д. Альбумін
- Е. Фібринолізин

11. Назвіть клас ліпопротеїнів крові, що переважно транспортують вільний та етерифікований холестерин:

- А. Ліпопротеїни високої щільності
- В. Ліпопротеїни низької щільності
- С. Ліпопротеїни проміжної щільності
- Д. Ліпопротеїни дуже низької щільності
- Е. Хіломікрони

12. Виберіть ліпопротеїни, що видаляють надлишок холестерину з клітин:

- А. Ліпопротеїни низької щільності
- В. Ліпопротеїни високої щільності
- С. Хіломікрони
- Д. Ліпопротеїни дуже низької щільності
- Е. Ліпопротеїни проміжної щільності

13. Назвіть атерогенні ліпопротеїни крові:

- А. Ліпопротеїни високої щільності
- В. Ліпопротеїни низької щільності
- С. Ліпопротеїни дуже низької щільності
- Д. Хіломікрони
- Е. Ліпопротеїни проміжної щільності

14. Укажіть, яке захворювання можна діагностувати, якщо при обстеженні у хворого знайшли підвищений вміст ЛПНЩ в сироватці крові:

- А. Гастрит
- В. Атеросклероз
- С. Запалення легень
- Д. Гострий панкреатит
- Е. Ушкодження нирок

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 9

1. ТЕМА: Залишковий азот крові і його фракційний склад. Діагностика порушень обміну пуринових нуклеотидів

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Вивчення функцій, хімічного складу крові у нормі та

при патологічних станах має велике значення для розуміння її ролі у координації взаємодії процесів метаболізму у різних органах та об'єднання їх у єдину систему. Аналіз основних компонентів залишкового азоту сироватки крові та безазотистих сполук відіграє важливу роль для корекції їх порушень.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичний матеріал з біохімії крові. Вміти визначити концентрацію сечової кислоти в сироватці крові.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Небілкові органічні сполуки плазми крові

Азотовмісні сполуки. Органічний азот біохімічних сполук, який можна визначити в надосадовій рідині після осадження білків плазми або сироватки крові, отримав у клінічній біохімії назву *залишкового* або *рест-азоту*. Цей небілковий азот складається з азоту таких кінцевих продуктів білкового і нуклеїнового катаболізмів як сечовина (50% усього небілкового азоту крові), сечова кислота (4%), креатин (5%), креатинін (2,5%), амінокислоти (25%), вільні нуклеотиди, аміак, індікан та деякі інші сполуки. Вміст небілкового азоту в крові становить 15-25 ммоль/л.

Сечовина – діамід карбонатної (вугільної) кислоти, який синтезується в гепатоцитах (в орнітиновому циклі Кребса-Гензелейта) для знешкодження високотоксичного амоніака. Це низькомолекулярна малотоксична водорозчинна сполука, яка фільтрується в ниркових клубочках з наступною значною пасивною реабсорбцією з водою в каналцях, особливо якщо швидкість току сечі знижується. Сечовина – основний кінцевий продукт обміну білків, за умов норми її концентрація в плазмі крові становить 3,3-8,3 ммоль/л (при гострій нирковій недостатності досягає 50-83 ммоль/л).

Концентрація сечовини в плазмі залежить від швидкостей її синтезу гепатоцитами і клубочкової фільтрації та швидкості ренальної перфузії.

Сечовина – осмотично активна рідина. Підвищення її рівня в крові супроводжується проникненням цього метаболіту через мембрани клітин разом з водою, що спричиняє набряк тканин паренхіматозних органів, міокарда, центральної нервової системи. Виведення сечовини з організму зменшує пастозність шкіри, набряк підшкірної жирової клітковини, зумовлює поліпшення функціонування міокарда. При патології зсув рівня сечовини в сироватці крові залежить від співвідношення процесів її утворення та виведення.

Сама сечовина малотоксична, набагато токсичніші катіони K^+ та похідні гуанідину, які накопичуються разом з нею в надлишковій кількості.

Клініко-діагностичне значення має відношення азоту сечовини до залишкового азоту, в нормі цей коефіцієнт становить приблизно 48%. При нирковій недостатності його значення підвищується до 90%, а при порушенні сечовиноутворювальної функції печінки коефіцієнт знижується.

Сечова кислота – кінцевий продукт катаболізму екзо- та ендогенних пуринів в організмі людини. За відсутності в їжі пуринів утворення та екскреція сечової кислоти відбувається з постійною швидкістю. Норма сечової кислоти в крові у чоловіків 0,24-0,46 ммоль/л, у жінок 0,16-0,38 ммоль/л.

Підвищення рівня сечової кислоти – гіперурикемія. Її прояви: нефропатії, сечокам'яна хвороба, поява тонусів, подагра. Гіперурикемія має місце при вроджених порушеннях пуринового обміну, порушенні виділення сечової кислоти з організму (захворювання нирок, пов'язані з ураженням ниркових клубочків (гострі та хронічні нефрити, уремія), ацидоз, гестоз, серцева декомпенсація, діабетична кома), порушенні обміну нуклеопротеїнів на тлі первинної та вторинної подагри, гематологічних (таласемія, перніціозна анемія, лейкози), серцево-судинних (інфаркт міокарда, атеросклероз, гіпертонічна хвороба), ендокринних захворюваннях (акромегалія, гіпопаратиреоз, цукровий діабет), тощо.

Гіпоурикемія розвивається внаслідок споживання їжі, багатої на вуглеводи та жири, при дефіциті білків, м'язовій атрофії, після лікування препаратами, що сприяють екскреції сечової кислоти з сечею, алопуринолом, пробенецидом, хініном, дефекті механізму реабсорбції сечової кислоти в ниркових канальцях тощо.

подагра. В крові сечова кислота знаходиться у вигляді малорозчинних солей – **уратів**. При перевищенні порогу їх розчинності (0,7 ммоль/л) вони кристалізуються, утворюючи **тофуси**. Урати, які накопичуються в міжклітинній рідині фагоцитуються, але фагоцити не спроможні розірвати пуринове кільце. Їх загибель призводить до виходу лізосомальних ферментів, активації вільнорадикального окислення та розвитку гострої запальної реакції в місцях накопичення уратів, зокрема в суглобах, спричиняючи виникнення **подагричного артриту**.

В порушеннях катаболізму пуринів відіграє роль спадкова (*рецесивна, зчеплена з X-хромосомою*) зміна активності ферментів метаболізму пуринів, в першу чергу:

збільшення активності ФРПФ-синтетази (посилення синтезу пуринів)

зниження активності гіпоксантин-гуанін-фосфорибозил-трансферази (оскільки ФРПФ не використовується для реутилізації пуринів, а бере участь в перші реакції їх синтезу, в даному випадку одночасно підвищується їх утворення та руйнування).

Креатин – важливий компонент залишкового азоту. Екзогенний креатин надходить з продуктами харчування (м'ясо, печінка), а ендогенний утворюється переважно в печінці та нирках із трьох амінокислот – аргініну, гліцину та метіоніну. В нирках за участі трансамідази (каталізує перенесення амідинового залишку аргініну на гліцин) утворюється попередник креатину – гуанідинацетатна кислота, яка метилюється в печінці під впливом S-аденозилметіоніну та метилтрансферази. З плином крові креатин переноситься в м'язову тканину, де відбувається його фосфорилування за допомогою креатинкінази з утворенням креатинфосфату. Вміст креатину в крові за умов норми становить у чоловіків 15,25-45,75 мкмоль/л і 45,75-76,25 мкмоль/л у жінок. Підвищення цього показника в сироватці крові спостерігають при: некрозі й атрофії скелетних м'язів; ендокринних захворюваннях (цукровий діабет, гіпертиреоз, акромегалія); лейкозах, інфекціях, опіках, ревматоїдному артриті, системному червоному вовчаку.

Креатинін. Креатинфосфат, утворений в мітохондріях міоцитів, в міофібрилах розпадається з утворенням креатиніну, залишку неорганічного фосфату, молекули води та вивільненням енергії. Креатинін не підлягає реабсорбції в канальцях нирок. В нормі концентрація креатиніну в крові у чоловіків становить 53-106 мкмоль/л, у жінок – 44-97 мкмоль/л.

Рівень креатиніну не залежить від хархових продуктів, навантажень, циркадних ритмів та інших біологічних констант. Креатинін – більш специфічний та чутливий показник функції нирок, ніж сечовина, оскільки в нормі не реабсорбується, а при підвищеній концентрації в крові активно екскретується. Визначення вмісту креатиніну використовують для оцінки швидкості клубочкової фільтрації (*проба Реберга*).

Креатинемія є характерною для ретенційної азотемії, яку спостерігають при гострій та хронічній нирковій недостатності, порушенні відтоку сечі внаслідок закупорки сечовивідних шляхів; опіків, м'язових дистрофій, непрохідності кишків, печінки, тяжкої форми цукрового діабету, гіпертиреозу, гіпофункції кіркової речовини надниркових залоз, акромегалії тощо. Зниження вмісту креатиніну спостерігають при зменшенні м'язової маси, в період вагітності (I і II триместри).

В крові постійно міститься деяка кількість **амінокислот** (3,5-6,5 г/л). Частина з них екзогенного походження, тобто поступає в кров при всмоктуванні з травного тракту, друга частина утворюється внаслідок розпаду білків тканин. Зміни вмісту загального амінного азоту в сироватці та сечі можуть служити показником переважання катаболічних чи анаболічних процесів в організмі. Кількість амінокислот в крові збільшується при захворюваннях печінки, діатезі, спазмофілії, фенілкетонурії, інфекційних захворюваннях, пухлинах, при деяких оперативних втручаннях тощо.

До складу залишкового азоту входить азот деяких так званих **молекул середньої маси**. Це поняття охоплює гетерогенну групу речовин різноманітної хімічної природи з Мм від 0,3 до 5 кДа: прості і складні пептиди – продукти деградації білків сироватки (β -ланцюги фібриногену і β_2 -мікроглобуліну), глікопротеїнів, нуклеопроїнів, гуморальні речовини і гормони (інсулін, глюкагон); олігосахариди; похідні глюкуронових кислот, деяких спиртів тощо. Залежно від виду патології та характеру ускладнень якісний склад молекул різний. Для прояву клінічних симптомів ендогенної інтоксикації необхідне підвищення рівня середніх молекул понад 3-5 разів. Особливо токсичними є речовини з Мм 1-1,1 кДа. Молекули середньої маси впливають на процеси життєдіяльності: різні ланки метаболізму, транспорт речовин, клітинний імунітет. Вони гальмують гліколіз, глюконеогенез, пригнічують синтез нуклеїнових кислот, гемоглобін і еритропоез, порушують тканинне дихання; мають імунодепресивну, цитотоксичну, нейро- і психотропну дії, антиагрегаційні та антикоагулянтні властивості. Виведення їх з організму здійснюється нирками і не підлягає реабсорбції в каналцях нирок, тому їх кліренс наближається до кліренсу інуліну і креатиніну.

Білірубін – це продукт розпаду гемі, важливий пігмент жовчі жовто-червоного кольору, нормальний компонент плазми крові (1,7-20,5 мкмоль/л). В результаті розпаду 1 г гемоглобіну утворюється 34 мг білірубіну. Вільний (непрямий) білірубін є водонерозчинним, токсичним і з'єднується з альбуміном плазми крові. Комплекс альбумін-білірубін надходить в печінку, і на поверхні плазматичної мембрани гепатоцита він підлягає дисоціації. При цьому звільнений білірубін потрапляє в гепатоцити. В печінці білірубін кон'югує з глюкуроною кислотою за допомогою глюкуронілтрансферази. Глюкуроніл-білірубін дістав назву прямого, зв'язаного білірубіну. Він розчинний у воді, малотоксичний і дає пряму реакцію з діазореактивом. Вміст прямого білірубіну в крові підвищується внаслідок зниженого синтезу та секреції жовчі, руйнування гепатоцитів при жировому гепатозі (стеатозі), гепатитах (вірусних, токсичних), цирозах печінки, паренхіматозній та обтураційній жовтяниці, раку печінки, синдромах Дабіна-Джонсона і Ротора, абсцесі печінки, жовтяниці вагітних; холециститі, холангіті, холестази; хронічному панкреатиті; гіпотиреозі в новонароджених.

Індикан – це калієва чи натрієва сіль індоксилсульфатної кислоти. Він утворюється в печінці в результаті естерифікації індолу, який, як і деякі інші токсичні сполуки (фенол, крезол, скатол) є наслідком гниття білків. Потрапляючи з плином крові ворітною веною в печінку, індол знешкоджується шляхом кон'югації з сульфатною або глюкуроною кислотами. Норма індикану в сироватці крові – 1,41-3,76 мкмоль/л; підвищення цього показника в крові спостерігають при ретенційній азотемії (ниркова недостатність, гломерулонефрит); порушенні функцій травного тракту та посиленому гнитті білків у кишках (знижена кислотність шлункового соку, закрепи, заворот кишок, защемлення киля, кишкова непрохідність); посиленому розщепленні білків в організмі (пухлини, емпієми, бронхоектази, абсцеси). Підвищення вмісту індикану до 4,7 мкмоль/л оцінюють як наслідок захворювань кишок, а більш високі показники пов'язують із патологією нирок.

Азотемія. При деяких патологічних станах рівень небілкового азоту в крові підвищується. Такий стан носить назву азотемії, яка може бути **абсолютною** (нагромадження в крові компонентів залишкового азоту) і **відносною** (наприклад, при опіках, блювоті, проносі). В залежності від причин, які викликають захворювання, абсолютну азотемію поділяють на ретенційну і продукційну.

Ретенційна азотемія виникає в результаті недостатнього виділення з сечею азотовмісних продуктів при нормальному надходженні їх в кров'яне русло. Вона може бути нирковою і позанирковою. **Ниркова ретенційна азотемія** є наслідком порушення екскреторної (видільної) функції нирок, а **позаниркова** виникає в результаті важкої недостатності кровообігу, зниження артеріального тиску, зменшення ниркового кровоплину при серцево-судинній декомпенсації. Підвищення залишкового азоту

відбувається за рахунок сечовини. Вміст сечовини при гострій нирковій недостатності складає: недостатність середньої тяжкості – до 16 ммоль/л, важкої – до 33,2 ммоль/л, дуже важкої (несприятливий прогноз) – вище 49,8 ммоль/л.

У випадку позаниркової азотемії вміст сечовини, як правило, не перевищує 13 ммоль/л.

Продукційна азотемія виникає при збільшеному поступленні азотовмісних продуктів в кров, передусім, як наслідок посиленого розпаду тканинних білків. Функція нирок при цьому не порушена. Це спостерігають при голодуванні, кахексії, пораненнях, інфекціях (лептоспіроз, дифтерія, скарлатина), кишковій непрохідності, тиреотоксикозі, лейкозах, мієломній і променевої хворобі, отруєнні хлороформом, тетрахлорметаном), під час лікування глюкокортикоїдами. Цей вид азотемії має характерний склад фракцій залишкового азоту: швидкість утворення сечовини відстає від продукції амінокислот, тому серед фракцій переважають амінокислоти, амоніак, сечова кислота, креатин та креатинін при незначній зміні абсолютного рівня сечовини. Вміст сечовини не перевищує 10 ммоль/л, а при тяжкому порушенні функцій печінки може бути зниженим!

Досить часто спостерігаються **азотемії змішаного типу**. В цих випадках важко відрізнити ретенційну азотемію від продукційної.

Безазотисті сполуки. До безазотистих хімічних компонентів плазми крові належать вуглеводи, ліпіди, органічні кислоти, які є метаболітами обміну речовин (молочна, піровиноградна, ацетооцтова кислоти, метаболіти циклу трикарбонових кислот). Всі ці сполуки є продуктами проміжного обміну вуглеводів і ліпідів, або відіграють роль поживних речовин.

В плазмі крові містяться переважно моносахариди: глюкоза, фруктоза, галактоза і деякі пентози (рибоза, дезоксирибоза). Концентрація лактату та пірувату в плазмі – 0,55-2,22 ммоль/л і 34,06-102,2 мкмоль/л відповідно.

Загальний вміст ліпідів в плазмі крові людини коливається залежно від режиму їжі та харчування та конституційних особливостей організму (віку, статі) і становить в середньому 5-7 г/л. За фізіологічних умов загальна кількість ліпідів крові може збільшуватися до 10-15 г/л після вживання їжі, збагаченої жирами (**аліментарна гіперліпемія**). Найбільшу кількість серед ліпідів плазми крові становлять триацилгліцероли (0,5-1,9 г/л), фосфоліпіди (1,1-2,75 г/л), холестерин загальний (1,5-2,6 г/л), холестерин естерифікований (1,0-2,1 г/л) та неестерифіковані жирні кислоти (0,08-0,2 г/л).

Ліпіди, як гідрофобні сполуки, не здатні знаходитися у вільному (розчинному) стані в плазмі крові, яка з фізико-хімічної точки зору є водно-сольовим розчином. Стабілізаторами ліпідів плазми є спеціальні білки – апопротеїни, які сприяють утворенню ліпо-протеїнових міцел, в складі яких різні класи ліпідів можуть транспортуватися кров'ю. Підвищення концентрації в плазмі крові різних класів ліпопротеїнів свідчить про серйозні зміни ліпідного обміну, найчастіше пов'язані з певними генетичними порушеннями.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Визначення поняття «залишковий азот крові» та клініко-діагностичне значення дослідження залишкового азоту крові.
2. Основні небілкові азотовмісні компоненти плазми крові, значення їхнього визначення при патологіях.
3. Клініко-діагностичне значення визначення сечовини в сироватці. Коефіцієнт відношення азоту сечовини до залишкового азоту крові при різноманітних патологіях.

4. Креатин і креатинін крові. Клініко-діагностичне значення визначення в сироватці крові.

5. Азотемії:

а) абсолютна: ретенційні та продуктивна

б) відносна (дегідратаційна)

6. Основні органічні безазотисті компоненти плазми крові, значення їхнього визначення при захворюваннях.

7. Спадкові та набуті порушення обміну пуринових нуклеотидів.

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 9

Дата:

1. Визначення концентрації сечової кислоти в біологічних рідинах ферментативним методом

Принцип методу: Сечова кислота під дією ферменту урикази окислюється до алантоїну з утворенням перекису водню. Пероксид водню реагує з хромогеном (4-аміноантипирин з N-етил-N-(гідрокси-3-сульфопропил)-m-толуїдином з утворенням синьо-фіолетового комплексу.

Урикази



Пероксидаза



Інтенсивність забарвлення розчину при довжині хвилі 550 нм прямопропорційна концентрації сечової кислоти в ньому.

Лінійність методу: 65,7-1190 мкмоль/л.

Концентрація сечової кислоти зберігається стабільною в сироватці (плазмі) протягом 3-х днів при кімнатній температурі, при температурі зберігання 2-8°C – протягом 7 днів, при температурі -20°C – протягом 6 місяців. Стабільність концентрації сечової кислоти в сечі – 4 дні при кімнатній температурі.

Обладнання і реagentи:

1. ФЕК: довжина хвилі 550 нм, довжина оптичного шляху 5 мм
2. Автоматичні або скляні піпетки на 20 мкл, 250 мкл і 1000 мкл
3. Сироватка крові, гепаринізована або ЕДТА-плазма, сеча. Сечу заздалегідь розвести дистильованою водою у співвідношенні 1:10!
4. Реагент 1 (хромоген-фосфатний буфер)
5. Реагент 2 (урикази)
6. Стандартний розчин (розчин сечової кислоти 357 мкмоль/л)
7. Дистильована вода

Приготування робочих розчинів.

1. Розчин 1. Уриказу розчиняють у 2,5 мл дистильованої води. Стабільність – 14 днів у посудині з темного скла при температурі +2 - +8°C.
2. Розчин 2. Вміст флакону з реактивом 1 змішати з розчином 1 у співвідношенні 20 : 1. Стабільність – 1 доба у посудині з темного скла при +2 - +8°C.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Холоста проба	Стандартна проба
Досліджуваний зразок	0,1	--	--
Стандартний розчин	--	--	0,1
Дистильована вода	--	0,1	--
Розчин 2	2	2	2

Перемішати вміст кожної пробірки. Інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі або 5 хвилин при температурі 37 °С. Виміряти оптичну щільність дослідної і стандартної проб проти холостої проби при довжині хвилі 550 нм. Забарвлення стабільне протягом 30 хвилин.

Розрахунок

Розрахунок за стандартом концентрації сечової кислоти в сироватці та в сечі проводять за формулами:

$$\text{Сечова кислота крові (мкмоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де $E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартної проби;

$C_{\text{ст}}$ – концентрація сечової кислоти в стандартному розчині

$$\text{Сечова кислота сечі (мкмоль/добу)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}} \times 11$$

де $E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби

$E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартної проби

$C_{\text{ст}}$ – концентрація сечової кислоти в стандартному розчині

11 – коефіцієнт розведення

Якщо концентрація сечової кислоти перевищує 1190 мкмоль/л (точка поза зоною лінійності калібрувального графіка), аналізований зразок (сироватка або сеча) слід розвести 1:1 фізіологічним розчином і повторити вимірювання, а отриманий результат розрахунку помножити на 2.

Заповнити таблицю:

№ п/п	№ зразка	Екстинкція	Абсолютне значення (г/л)
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Висновок:

2. Визначення сечової кислоти в біологічних рідинах за методом Мюллера-Зейферта

Принцип методу: Сечова кислота у лужному середовищі відновлює фосфорновольфрамований реактив у сполуку синього кольору. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації сечової кислоти.

Обладнання та реагенти:

1. ФЕК: довжина хвилі 650 нм; довжина оптичного шляху 10 мм
2. Центрифуга, автоматичні або скляні піпетки на 1, 5 та 10 мл
3. Фосфорновольфрамований реактив
4. Кислота сірчана
5. Вольфромат натрію
6. Карбонат натрію
7. Стандартний розчин сечової кислоти (300 мкмоль/л)
8. Сироватка крові або сеча (розведена у 10 разів дистильованою водою).

Приготування робочого розчину карбонату натрію:

В мірну колбу на 200 мл перенести вміст флакону з карбонатом натрію, прилити 130-150 мл дистильованої води, перемішати до повного розчину осаду, довести об'єм розчину до мітки. Розчин стабільний при t від 0 до плюс 25°C.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Холоста проба	Стандартна проба
Дистильована вода	4,0	4,5	4,0
Досліджуваний зразок (сироватка)	0,5	--	--
Стандартний розчин	--	--	0,5
Кислота сірчана	0,25	0,25	0,25
Вольфромат натрію	0,25	0,25	0,25
Перемішати, витримати 10 хвилин при кімнатній температурі			
Центрифугувати 10 хвилин при 1500 – 2000 об/хв			
Надосадкова рідина	2,0	2,0	2,0
Розчин карбонату натрію	1,0	1,0	1,0
Фосфорновольфрамований реактив	0,6	0,6	0,6
Перемішати, витримати 30 хвилин при кімнатній температурі, виміряти оптичну щільність дослідної та стандартної проби проти холостої			

Зразки стабільні 3-5 днів при температурі +4°C, до 6 місяців при температурі – 20°C. В випадку дослідження сечі використовують добову сечу, в яку доданий NaOH для збереження лужного середовища.

Визначенню в сироватці (плазмі) заважають оксалати. Їжа збагачена пуринами (печінка, нирки) а також важка фізична праця може викликати підвищення рівня сечової кислоти.

Розрахунок.

$$\text{Сечова кислота (ммоль/л)} = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де $E_{\text{дос}}$ – оптична щільність дослідної проби

$E_{\text{ст}}$ – оптична щільність стандартної проби

$C_{\text{ст}}$ – концентрація сечової кислоти в стандартному розчині

Для розрахунку концентрації сечової кислоти в сечі результат необхідно помножити на коефіцієнт розведення – 10

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення (мм/л)
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Висновки:

Клініко-діагностичне значення

В нормі вміст сечової кислоти в сироватці крові у чоловіків **214-488 мкмоль/л**, жінок – **137-363 мкмоль/л**, в сечі – **333–583 ммоль/добу**. Причинами підвищення рівня сечової кислоти в крові є подагра, лейкози, В₁₂-дефіцитна анемія, злоякісні новоутворення, масивні опіки, деякі захворювання залоз внутрішньої секреції, порушення виділення сечової кислоти нирками, їжа, що багата пуринами. Зниження концентрації сечової кислоти у крові спостерігається при гепатобіліарній дегенерації печінки (хворобі Вільсона-Коновалова), лімфогрануломатозі, мієломній хворобі та ін. захворюваннях.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім виконання описаних робіт, проводиться визначення залишкового азоту та його фракцій на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть небілкові азотовмісні сполуки:

- A. Сечова кислота
- B. Креатин
- C. Креатинін
- D. Сечовина
- E. Усі зазначені вище

2. Збільшення яких метаболітів у крові приводить до стану ацидозу:

- A. Амонійних солей
- B. Кетонових тіл
- C. Глюкози
- D. Лактози
- E. Сечової кислоти

3. Кінцевим продуктом пуринового обміну в організмі людини є:

- A. Сечовина
- B. Креатинін
- C. Сечова кислота

- D. Індикан
- E. Всі відповіді вірні

4. Гіперурикемія спостерігається при:

- A. Захворюваннях нирок
- B. Голодуванні
- C. Прийомі алкоголю
- D. Прийомі деяких лікарських препаратів
- E. Всі відповіді вірні

5. Назвіть принцип фотометричного методу визначення сечової кислоти:

- A. Утворення забарвленого комплексу при відновленні фосфорновольфрамового реактиву сечовою кислотою
- B. Утворення забарвленого комплексу при взаємодії з фосфорною кислотою
- C. Утворення забарвленого комплексу сечовою кислотою з сульфосаліциловою кислотою
- D. Утворення забарвленого комплексу при взаємодії з сірчаною кислотою
- E. Утворення забарвленого комплексу при взаємодії з карбонатом натрію

6. Перелічіть можливі помилки при визначенні сечової кислоти:

- A. Неточне приготування розчинів
- B. Нестабільність стандартного розчину
- C. Недотримання часу осадження білків
- D. Недостатнє центрифугування
- E. Всі перелічені

7. Назвіть захворювання, при яких визначення сечової кислоти має діагностичне значення:

- A. Подагра
- B. Гепатити
- C. Прогресуюча м'язова атрофія
- D. Пневмонія
- E. Ниркова недостатність

8. Вкажіть діапазон нормальних значень сечової кислоти у сечі:

- A. 30 – 300 мкмоль/добу
- B. 300 – 580 мкмоль/добу
- C. 550 – 900 мкмоль/добу
- D. 10 – 300 мкмоль/добу
- E. Більше 1000 мкмоль/добу

9. Вкажіть діапазон нормальних значень сечової кислоти у сироватці крові чоловіків:

- A. 130 – 360 мкмоль/л
- B. 220 – 500 мкмоль/л
- C. 500 – 900 мкмоль/л
- D. 100 – 300 мкмоль/л
- E. Менше 10 мкмоль/л

10. Вкажіть діапазон нормальних значень сечової кислоти у сироватці крові жінок:

- A. 130 – 360 мкмоль/л
- B. 220 – 500 мкмоль/л
- C. 500 – 900 мкмоль/л
- D. 100 – 300 мкмоль/л
- E. Менше 100 мкмоль/л

11. Найбільш значною частиною залишкового азоту сироватки крові є :

- A. Аміак
- B. Сечовина
- C. Сечова кислота
- D. Креатинін
- E. Індикан

12. В нормі рівень сечовини в сироватці крові дорівнює:

- A. 0,7 – 1,5 ммоль/л
- B. 1,7 – 8,3 ммоль/л
- C. 8,0 – 15,5 ммоль/л
- D. 15,0 – 30,0 ммоль/л
- E. 20,0 – 40,0 ммоль/л

13. Вміст сечовини досліджують з метою:

- A. Встановлення стану білкового обміну
- B. Функціонального стану печінки
- C. Функціонального стану нирок
- D. Порухення екскреторної функції нирок
- E. Всі відповіді вірні

14. При яких захворюваннях спостерігається продукційна азотемія:

- A. Тяжкі опіки
- B. Злоякісні новоутворення в стадії розпаду та інфекційні захворювання з деструкцією
- C. Лейкози
- D. Обширні ураження, синдром стиснення
- E. Всі відповіді вірні

15. Назвіть найбільш специфічний метод визначення сечовини:

- A. Газометричний
- B. Діацетилмонооксимний
- C. Уреазний
- D. Хроматографічний
- E. Рефрактометричний

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 10

1. ТЕМА: Спадкові порушення орнітинового циклу сечовиноутворення. Гіперамоніємії і їх лабораторна діагностика.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Амоніак – токсична речовина, яка має виводитись з організму. Порушення шляхів нейтралізації амоніаку (синтез сечовини) та спадкові ферментопатії його обміну призводять до значного порушення фізичного та нервово-психічного стану.

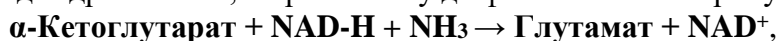
3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити основні шляхи утворення та механізми утилізації аміаку в організмі. Вміти трактувати біохімічні особливості обміну небілкових азотовмісних сполук.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Всі уреотелічні організми (*в т.ч. й людина*) в якості кінцевого продукту азотистого обміну виділяють в навколишнє середовище сечовину – головний продукт остаточної нейтралізації високотоксичного амоніаку.

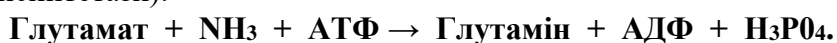
Токсичність амоніаку для організму людини визначається наступними порушеннями функціонування тканин, які він зумовлює:

1. Амоніак в мітохондріях змінює перебіг реакції, яка каталізується глутаматдегідрогеназою, в протилежну до фізіологічної сторону – до утворення глутамату:



що призводить до зниження концентрації α -кетоглутарату (одного з головних метаболітів ЦТК) та виникнення гіпоенергетичного стану.

2. Високі концентрації амоніаку стимулюють синтез глутаміну (за участі глутамінсинтетази):



Накопичення глутаміну в астроцитах підвищує в них осмотичний тиск, що може викликати набряк мозку.

3. Зниження концентрації глутамату порушує синтез **основного гальмівного медіатора** головного мозку – ГАМК (*γ -аміномасляної кислоти*), а також обмін амінокислот (*реакції трансамінування*). При недостатності ГАМК та інших медіаторів порушується прове-

дення нервових імпульсу, виникають судоми.

4. Надлишок іону амонію порушує трансмембранне переміщення одновалентних катіонів Na^+ та K^+ , конкуруючи з ними за іонні канали (*оскільки NH_4^+ не здатний проникати через мембрани*), що також впливає на проведення нервових імпульсів.

5. Зниження концентрації метаболітів ЦТК визиває компенсаторне посилення синтезу оксалоацетату з пірувату, що супроводжується інтенсивним споживанням CO_2 . Гіпокапнія через підвищене споживання CO_2 при гіпер-амоніємії особливо характерна для клітин головного мозку.

6. Підвищення концентрації амоніаку у крові визиває алкалоз (*зміщення рН в лужну сторону*), що збільшує спорідненість гемоглобіну до кисню та веде до гіпоксії тканин, від якої, насамперел, страждає головний мозок.

Амоніак безперервно утворюється в усіх органах та тканинах, особливо в тканинах з високою інтенсивністю обміну амінокислот та біогенних амінів (нервова тканина, печінка, м'язи, кишківник). Його основні джерела:

- окислювальне дезамінування глутамату – всі тканини (*крім м'язової*), особливо в печінці та нирках
- неокислювальне дезамінування серину, треоніну, гістидину в печінці
- гідролітичне дезамінування амідів (глутаміну та аспарагіну) – в печінці, нирках та кишківнику
- катаболізм біогенних амінів – в усіх тканинах, особливо в нервовій
- дезамінування пуринових та катаболізм піримідинових азотистих основ в усіх тканинах
- життєдіяльність бактерій **ШКТ**.

Оскільки амоніак є надзвичайно токсичною сполукою (передусім, нейротоксичною), в тканинах існує декілька шляхів його знешкодження:

1. Синтез глутаміну (*взаємодія глутамату з амоніаком в мітохондріях клітин*) – головний спосіб тимчасового зв'язування амоніаку, найбільш активно відбувається в нервовій та м'язовій тканинах, в печінці, нирках, сітчатці. Глутамін легко проникає в усі клітини (полегшена дифузія), де є потреба в аміногрупах для синтезу нуклеотидів, аргініну, аспарагіну, глюкозаміну (попередника всіх інших аміноукрів).

2. Синтез аспарагіну (*взаємодія аспартату з амоніаком*) – другорядний спосіб тимчасового зв'язування амоніаку. Енергетично не вигідний для клітин, оскільки при цьому відбувається гідроліз АТФ до АМФ.

3. Синтез глутамату (*взаємодія α -кетоглутарату з амоніаком*) – відновлювальне амінування за участю глутаматдегідрогенази (кофермент НАДФ-Н). Може відбуватись в усіх тканинах (крім м'язової), але тільки при значних концентраціях амоніаку, оскільки для глутаматдегідрогенази головним субстратом є глутамат, і в фізіологічних умовах реакція протікає в сторону його дезамінування та утворення α -кетоглутарату.

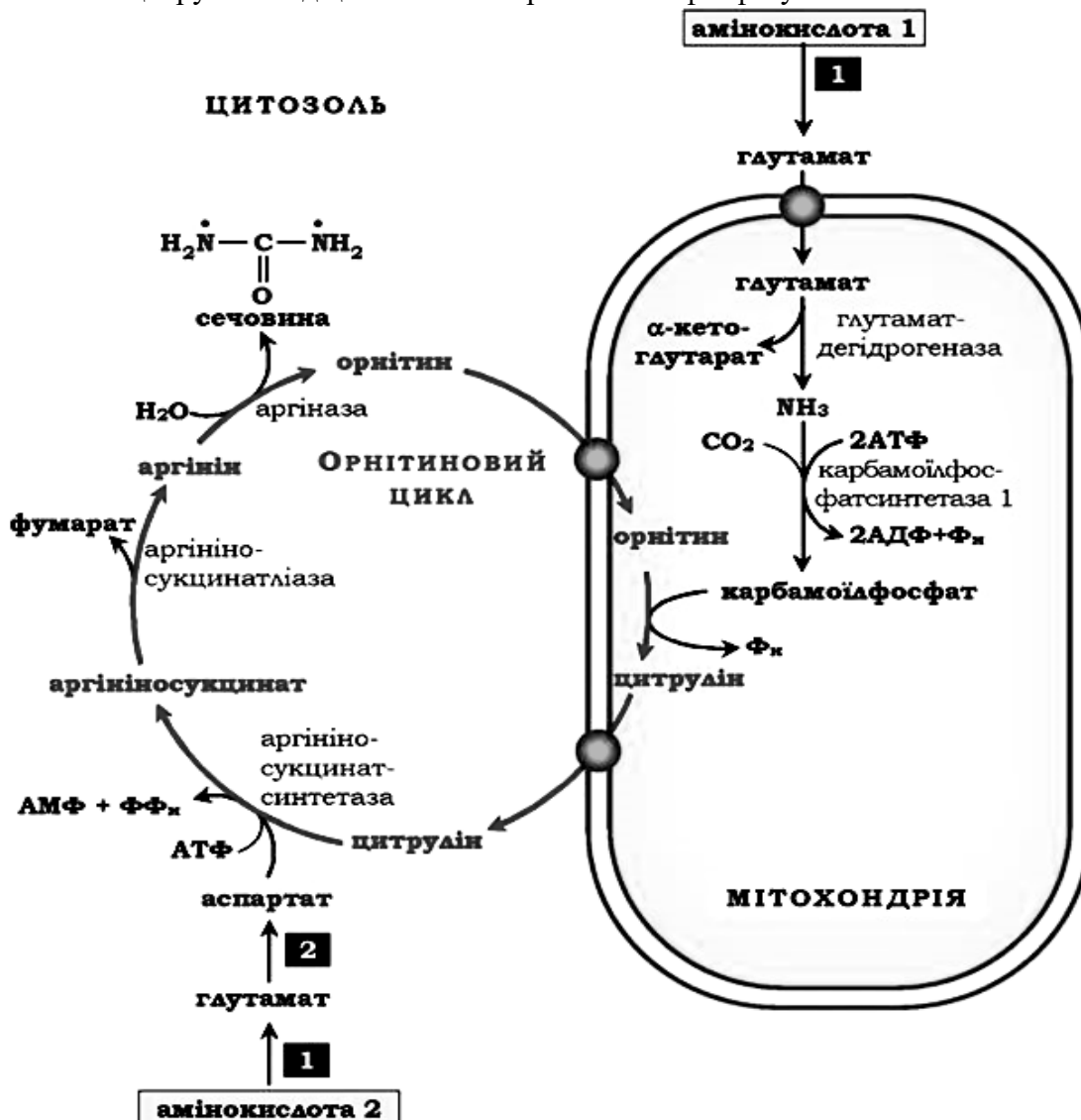
4. Синтез солей амонію (NH_4Cl) – відбувається лише в нирках

5. Синтез карбамоїлфосфату (*утворення сечовини*) – головний, найбільш надійний та ефективний спосіб остаточної нейтралізації амоніаку, відбувається в гепатоцитах

Сечовина – основний кінцевий продукт обміну білків, її концентрація в плазмі крові становить 3,3-8,3 ммоль/л. В 40-х роках ХХ ст. німецькі біохіміки Г. Кребс і К. Гензелейт встановили, що синтез сечовини являє собою циклічний процес, який складається з декількох стадій, ключовою сполукою якого є орнітин, котрим починається і завершується цикл. Тому процес синтезу сечовини отримав назву орнітиновий цикл або цикл Кребса - Гензелейта. На наступній сторінці представлена його схема.

1. Джерелом першого атома азоту в сечовині виступає амоніак, що зв'язується з CO_2 з утворенням карбамоїлфосфату. Реакція каталізується амоніак- Mg^{2+} -залежною карбамоїлфосфатсинтетазою I та відбувається за участю 2 молекул АТФ. Одна молекула АТФ активує бікарбонат, а інша служить донором фосфатної групи карбамоїлфосфату. Карбамоїлфосфатсинтетаза I знаходиться в матриксі мітохондрій гепатоцитів, вона використовує аміак як донор азоту і її активність залежить від N-ацетилглутамату (позитивний ефектор). Існує також глутамін-залежна карбамоїлфосфатсинтетаза II, яка локалізується в цитоплазмі практично всіх клітин, її активність не залежить від N-ацетилглутамату. Вона для синтезу використовує амідну групу глутаміну, а утворений карбамоїлфосфат іде на синтез піримідинів для нуклеотидів – мономерів нуклеїнових кислот.

2. Далі під дією орнітинкарбамоїлтрансферази карбамоїльна група карбамоїлфосфату переноситься на α -амінокислоту орнітин і утворюється інша α -амінокислота – цитрулін з відщепленням неорганічного фосфату.



Перші дві реакції відбуваються в мітохондріях гепатоцитів. Потім утворений цитрулін транспортується в цитозоль, де здійснюються наступні перетворення.

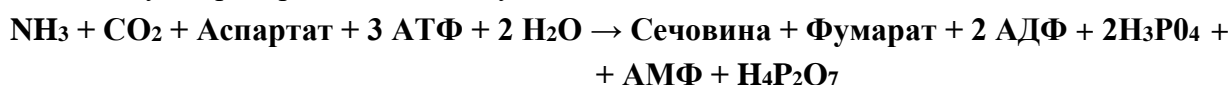
3. В наступній реакції аргінінсукцинатсинтетаза зв'язує цитрулін з аспаратом і утворює аргінінсукцинат (аргінінобурштинову кислоту). Цей фермент потребує іонів Mg^{2+} . В реакції затрачається молекула АТФ, а аспарат вис-тупає джерелом другого атома азоту сечовини. Молекула АТФ розпадається до АМФ і пірофосфату, що еквівалентно гідролізу двох молекул АТФ.

4. Розщеплення аргініносукцинату під дією ферменту *аргініносукцинатліази*; продуктами реакції є аргінін – безпосередній попередник сечовини та фумарат. При цьому аміногрупа аспартату опиняється в молекулі аргініну.

5. Гідроліз аргініну при дії ферменту *аргінази* з утворенням сечовини та регенерацією орнітину (завершення метаболічного циклу). Утворений орнітин взаємодіє з новою молекулою карбамоїлфосфату і цикл замикається.

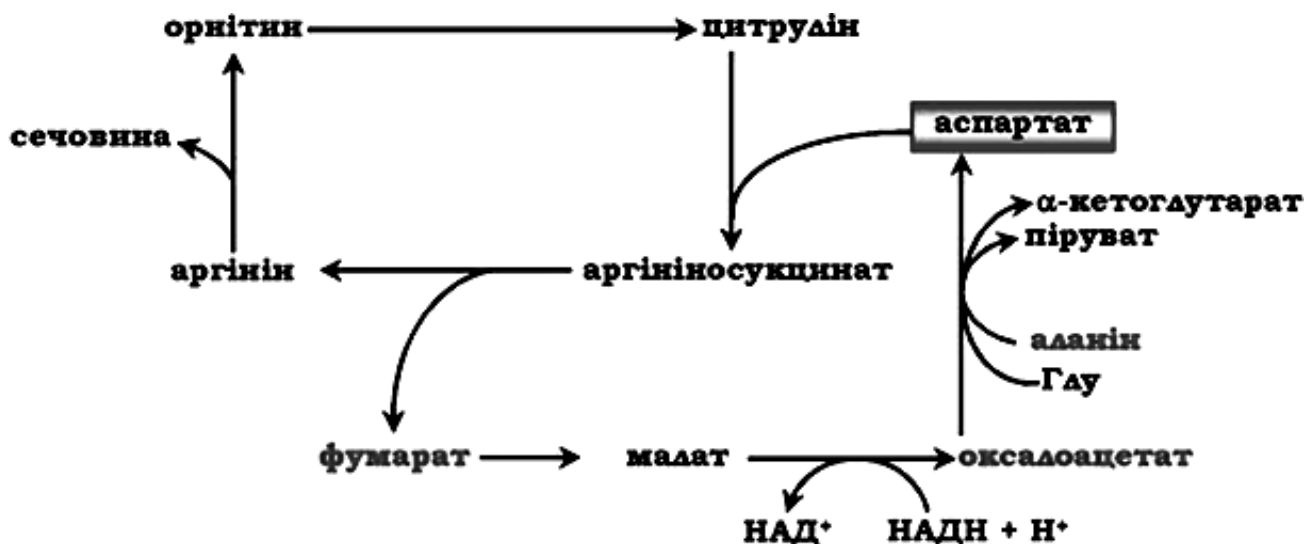
Оскільки окиснювальне дезамінування глутамату відбувається в мітохондріях, а ферменти орнітинового циклу розподілені між мітохондріями та цитозолем, тому необхідне трансмембранне перенесення глутамату, цитруліну та орнітину з допомогою специфічних транслоказ.

Суммарне рівняння синтезу сечовини:



З врахуванням того, що $AMF + ATP \rightarrow 2 ADF$, загальні енерговитрати на синтез 1 моля сечовини складають **4 моля АТФ!**

Фумарат, який утворюється в аргініносукцинатліазній реакції (4), є проміжним метаболітом циклу трикарбонових кислот, в якому він перетворюється в малат, а той в оксалоацетат. Одним із шляхів метаболізму оксалоацетату є його трансамінування з аланіном, який надходить головним чином із м'язів і еритроцитів, з утворенням пірвіноградної кислоти й аспартату. Останній може знову вступати в цикл сечовини, а пірват використовується для глюконеогенезу. Таким чином, через фумарат існує тісний взаємозв'язок між орнітиновим циклом і ЦТК. Крім того в ЦТК утворюються CO_2 і АТФ, які також необхідні для синтезу сечовини. Взаємозв'язок між даними циклами показаний на схемі.



В реакціях орнітинового циклу витрачається чотири макроергічні зв'язки трьох молекул АТФ на кожен оберт циклу. Витрати енергії відбуваються також і при трансмембранному перенесенні речовин, пов'язаних із синтезом та екскрецією сечовини. Проте процес перетворення амінокислот в безазотисті залишки й сечовину має наступні шляхи компенсації енерговитрат:

- при включенні фумарату в ЦТК на стадії дегідратування малату утворюється НАД-Н, яка забезпечує синтез трьох молекул АТФ
- при окисному дезамінуванні глутамату в різних органах також утворюється НАД-Н і, відповідно, ще три молекули АТФ.

Орнітиновий цикл в печінці виконує дві функції, забезпечуючи:

- перетворення азоту амінокислот в сечовину, яка екскретується й запобігає накопиченню токсичних продуктів, головним чином амоніаку;
- синтез аргініну та поповнення його фонду в організмі.

Регуляторні стадії процесу – синтез карбамоїлфосфату, синтез цитруліну й завершальна стадія, що каталізується аргіназою.

Повний набір ферментів орнітинового циклу є тільки в гепатоцитах. Окремі ж ферменти цього циклу знаходять не лише в печінці, але й в інших клітинах. В ентероцитах, на-приклад, є карбамоїлфосфатсинтетаза I та орнітин-карбамоїлтрансфераза, отже, може синтезуватися цитрулін. В нирках виявлені аргінінсукцинатсинтетаза та аргінінсукцинатліаза. Цитрулін, що утворився в ентероцитах, може надходити в нирки й перетворюватись там у аргінін, який переноситься в печінку та гідролізується аргіназою. Проте активність цих розсіяних по різних органах ферментів значно нижча, ніж у печінці.

Ефективність роботи орнітинового циклу при нормальному харчуванні людини і помірних навантаженнях – близько 60% його потужності. Це забезпечує уникнення розвитку гіперамоніємії при збільшенні кількості білка в їжі, при тривалій інтенсивній фізичній роботі або довготривалому голодуванні, при патологічних станах, які супроводжуючихся інтенсивним розпадом білків тканин. Проте відомі вроджені метаболічні порушення (ензимопатії), які призводять до швидкого розвитку гіперамоніємії. Вони пов'язані з дефектом одного з ферментів, що беруть участь в синтезі сечовини. Нижче представлені варіанти гіперамоніємії з зазначенням ензимодефекту та лабораторних показників.

Захворювання	Дефект ферменту	Метаболіти	
		кров	сеча
Гіперамоніємія тип I	Карбамоїлфосфатсинтетаза I	Глн, Ала NH ₃	Оротат
Гіперамоніємія тип II **	Орнітин-карбамоїлтрансфераза	Глн, Ала NH ₃	Оротат
Цитрулінемія	Аргініно-сукцинатсинтетаза	Цитр NH ₃	Цитр
Аргініносукцинатурія	Аргініно-сукцинатліаза	Арг-сукц NH ₃	Арг-сукц Глн, Ліз
Гіпераргінінемія	Аргіназа	Арг NH ₃	Арг, Ліз Орнітин

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Фактори токсичності амоніаку
2. Основні джерела утворення амоніаку в організмі
3. Біохімічні механізми тимчасової та остаточної нейтралізації амоніаку
4. Реакції синтезу сечовини в орнітиновому циклі Кребса-Гензелейта
5. Генетичні аномалії ферментів циклу утворення сечовини. Характеристика гіперамоніємії

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол №10

Дата:

Кількісне визначення сечовини в сироватці крові

Принцип методу:

Сечовина утворює із діацетилмонооксидом в присутності іонів Fe (III) і тіосемикарбазиду комплекс червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації сечовини.

Проведення аналізу

Аналіз проводиться згідно таблиці.

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Діацетил-монооксим	2,0	2,0
Гіосемикарбазид	2,0	2,0
Сироватка	0,02	--
Фізіол. Розчин	--	0,02

Пробірки закривають алюмінієвою фольгою й поміщають у киплячу водянну баню на 10 хв. Потім їх вміст швидко охолоджують під холодною водою й одразу на фотоколориметрі визначають оптичну щільність дослідної проби проти контрольної. Вимір слід проводити не більше, ніж через 15 хвилин після охолодження при світло-зеленому світлофільтрі в кюветі товщиною 10 мм

Розрахунок:

$$C = 16,64 \times (E_{\text{дослід}}/E_{\text{калібр}})$$

де С- концентрація сечовини в сироватці, (ммоль/л)

$E_{\text{дослід}}$ - оптична щільність дослідної проби

$E_{\text{калібр}}$ - оптична щільність каліброваної проби = 0,16

В сироватці крові здорової людини міститься 3,33-8,32 ммоль/л сечовини.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення (мм/л)
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Висновки:

Клініко-діагностичне значення:

Зниження вмісту сечовини спостерігається при паренхіматозному гепатиті, цирозі печінки (різке зниження сечовиноутворюючої функції печінки), під час вагітності. Вміст сечовини може підвищуватися при нефритах, гарячкових станах, сепсисі, туберкульозі нирок та ін.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім виконання описаних робіт, проводиться визначення залишкового азоту та його фракцій на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Вкажіть регуляторний фермент орнітинового циклу:

А. Орнітиндекарбоксилаза

В. Цитрулінсинтетаза

С. Карбамоїлфосфатсинтетаза

D. Аргіназа

E. Аргінінсукцинатліаза

2. Укажіть, в якій тканині переважно локалізований процес утворення сечовини:

A. Нирок

B. Кишечника

C. Печінки

D. М'язів

E. Підшлункової залози

3. Укажіть клітинну локалізацію процесу утворення сечовини:

A. Апарат Гольджі

B. Мітохондрії

C. Лізосоми

D. Цитозоль

E. Ядро

4. Укажіть, за рахунок якого процесу відбувається знешкодження аміаку в тканині нирок:

A. Синтезу амонійних солей

B. Відновного амінування

C. Непрямого дезамінування

D. Синтезу сечовини

E. Синтезу біогенних амінів

5. Укажіть процес, за рахунок якого переважно відбувається знешкодження аміаку в нервовій тканині:

A. Трансамінування

B. Синтезу сечовини

C. Утворення амідів дикарбонових амінокислот

D. Синтезу амонійних солей

E. Синтезу біогенних амінів

6. З наведеного списку виберіть транспортну форму аміаку крові:

A. Аланін

B. Ізолейцин

C. Амонійна сіль

D. Глутамін

E. Сечовина

7. У дитини 3 років після перенесеної важкої вірусної інфекції спостерігаються повторна блювота, втрата свідомості, судоми. При дослідженні виявлено гіперамоніємію. З чим пов'язані зміни біохімічних показників крові дитини?

A. Активація процесів декарбоксілювання амінокислот

B. Порушення знешкодження біогенних амінів

C. Пригнічення активності ферментів трансамінування

D. Порушення знешкодження аміаку в орнітиновому циклі

E. Посилення гниття білків в кишечнику

8. У хлопчика 4 років після перенесеного важкого вірусного гепатиту – блювота, втрата свідомості, судоми. В крові – гіперамоніємія. Порушення якого біохімічного процесу викликало паталогічний стан хворого?

A. Порушення знешкодження аміаку в печінці

B. Порушення знешкодження біогенних амінів

C. Пригнічення ферментів трансамінування

D. Посилення гниття білків в кишечнику

Е. Активація декарбоксілювання амінокислот

9. У новонародженій дитини спостерігається зниження інтенсивності смоктання, часта блювота, гіпотонія. В сечі та крові значно підвищена концентрація цитруліну. Порушення якого метаболічного процесу має місце?

А. ЦТК

В. Глюконеогенез

С. Цикл Корі

Д. Гліколіз

Е. Орнітиновий цикл

10. Основна маса азоту з організму виводиться у вигляді сечовини. Зниження активності якого фермента в печінці приводить до гальмування синтезу сечовини та накопиченню амоніаку у крові та тканинах?

А. Аспартатамінотрансфераза

В. Амілаза

С. Уреаза

Д. Пепсин

Е. Карбамоїлфосфатсинтаза

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 11

1. ТЕМА: Патології обміну окремих амінокислот та їх лабораторна діагностика (семінар).

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Спадкові ферментопатії обміну деяких амінокислот призводять до значного порушення фізичного та нервово-психічного стану.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити основні форми порушень обміну амінокислот в організмі. Вміти трактувати біохімічні особливості обміну окремих амінокислот в світлі виникнення молекулярних патологій.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

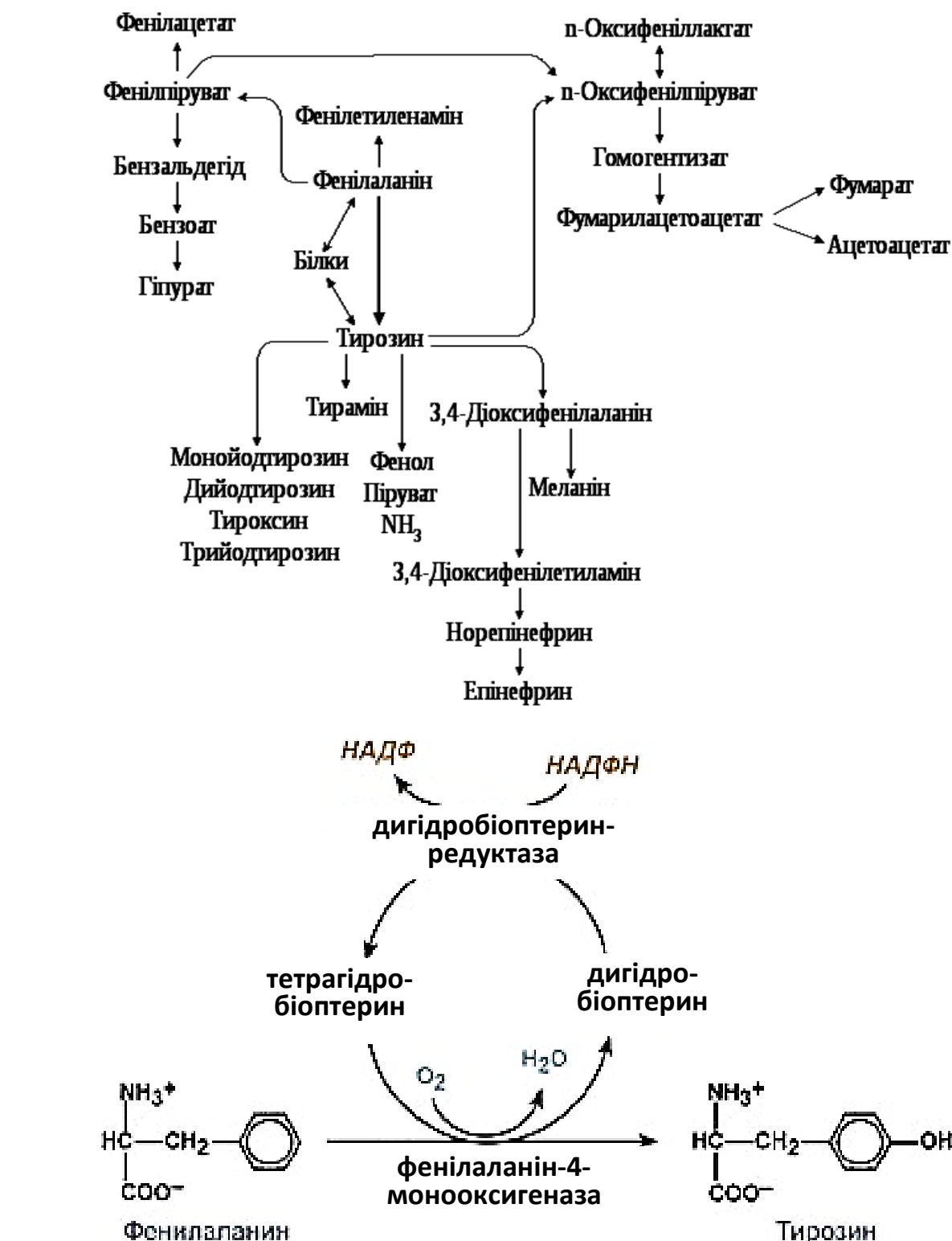
Крім загальних шляхів обміну амінокислот (реакцій транс-, дезамінування та декарбоксілювання), існують спеціалізовані шляхи їх перетворень, метою яких є синтез з них численних фізіологічно активних сполук. Спадкові порушення обміну амінокислот є найбільш вивченою групою генетично детермінованих ензимопатій. Вони обумовлені рецесивними мутаціями генів, локалізованих в аутозомах. В результаті ензиматичного дефекту амінокислоти не утилізуються в організмі фізіологічним шляхом, а в тканинах і біологічних рідинах накопичуються недоокислені продукти їх порушеного метаболізму, що проявляють токсичну дію на тканини і органи, в першу чергу на нервову систему. Більшість порушень проявляється в перші тижні/місяці життя (*диспептичний синдром, неврологічні розлади та зміни шкіри*). Вдосконалення методів діагностики дозволило встановити частоту цієї групи захворювань, визначити їх значення і питому вагу в структурі патології раннього віку. Аміноацидопатії складають 31% всіх спадкових порушень метаболізму.

Обмін фенілаланіну та тирозину і його спадкові порушення. Особливістю метаболізму ароматичних амінокислот (фенілаланіну та тирозину) є утворення з них катехоламінів (дофаміну, норадреналіну, адреналіну), тиреоїдних гормонів та меланінів, а також в катаболізмі надлишку даних амінокислот в гепатоцитах. Загальні шляхи їх метаболізму представлені на схемі на наступній сторінці.

Катаболізм фенілаланіну (1-5%) полягає в трансамінуванні з утворенням (через фенілпіруват) кінцевого метаболіту фенілацетату, що екскретується.

Анаболічний шлях – синтез з фенілаланіну всіх зазначених фізіологічно активних сполук – починається з його перетворення на тирозин (95-99%), відбувається під дією ферменту *фенілаланінгідроксилази* (кофермент – тетрагідробіоптерин).

Фенілкетонурія (фенілпіровиноградна олігофренія) – це ензимопатія, спричинена генетичним дефектом синтезу *фенілаланінгідроксилази* (класична форма) або порушенням системи регенерації її кофермента – тетрагідробіоптерину (варіантна форма). Схема роботи ензиму представлена на наступній сторінці. Внаслідок блоку перетворення фенілаланіну на тирозин в організмі накопичується фенілаланін та його побічні метаболіти – фенілпіруват, феніл лактат і фенілацетат. Надлишок фенілкетонів порушує нормальний розвиток мозку дитини і є причиною розумової відсталості та судом. Концентрація фенілаланіну в крові



рих значно зростає – до 100-800 мг/л (норма – 10-40 мг/л). Концентрація фенілаланіну може бути виміряна в пробі капілярної крові, взятої з п'ятки дитини на 6-10-й день після народження. Ця методика придатна для масових скринінгових обстежень. Фенілпіровиноградна кислота сечі реагує з хлорним залізом, однак таке тестування може

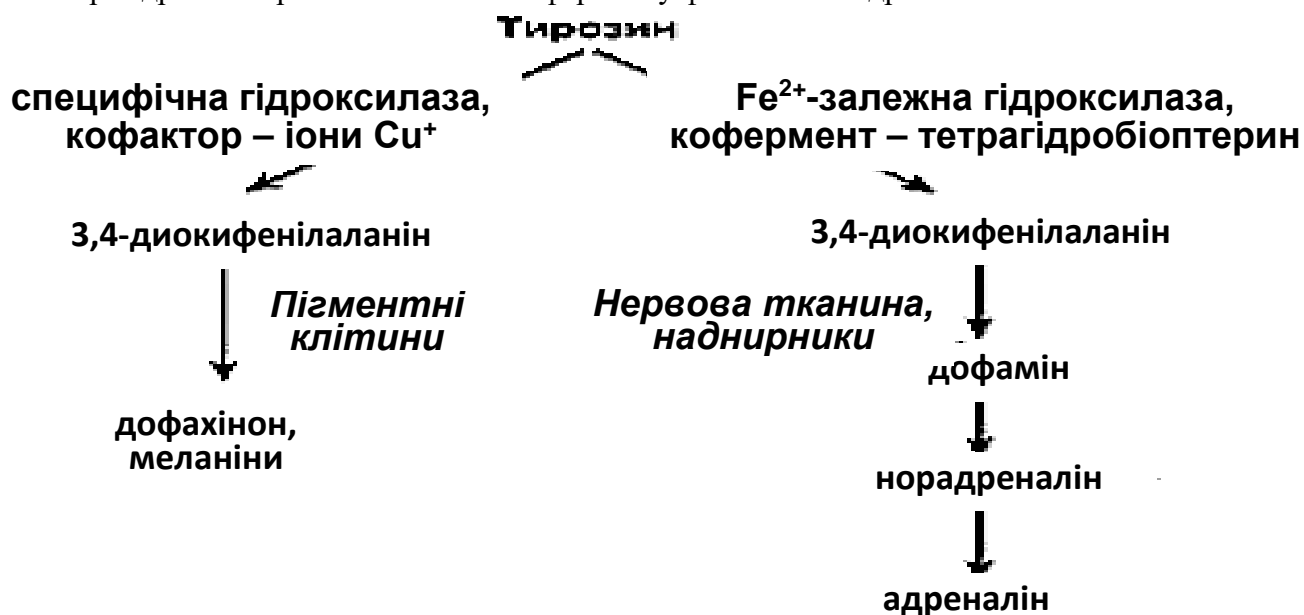
дати позитивний результат тільки приблизно через 6 тижнів після народження, коли вже можуть розвинутися незворотні ураження головного мозку. В багатьох дітей із фенілкетонурією світле волосся і голубі очі, що пов'язане з недостатністю синтезу меланіну, оскільки тирозин є попередником меланіну. Лікування полягає в обмеженні споживання фенілаланіну з використанням дієти, що базується на спеціальних білках і амінокислотах. Фенілаланін – незамінна амінокислота, тому невелика її кількість усе ж повинна бути присутньою у дієті. У той же час необхідно вводити з їжею адекватну кількість тирозину, оскільки тирозин стає незамінною амінокислотою у хворих на фенілкетонурію. За дотримання вказаної дієти діти, яким діагноз фенілкетонурія було поставлено одразу після народження, ростуть і розвиваються нормально.

Шляхи метаболізму тирозину:

- синтез катехоламінів
- синтез меланінів
- синтез тиреоїдних гормонів
- катаболізм в гепатоцитах

Феніл: **фенілаланін** в та меланінів починається з окисне **тирозин** окси- астю двох різних специфічних гідр **тирозин** ому утворення катехоламінів відбувається через декарбоксілювання ДОФА до дофаміну, а меланінів – через окиснення до дофахінону.

Альбінізм – ензимопатія, біохімічною основою якої є спадкова недостатність специфічної тирозинази (кофактор – іони Cu^+), яка каталізує реакції утворення пігментів. Відсутність меланінів в меланоцитах проявляється недостатньою (або відсутньою взагалі) пігментацією шкіри та волосся, підвищеною чутливістю шкіри до сонячного світла; часто знижена гострота зору, світлобоязнь. Синтез катехоламінів при цьому не порушений, оскільки в ньому бере участь зовсім інший фермент – Fe^{2+} -залежна гідроксилаза, кофермент якої тетрагідробіоптерин аналогічний коферменту фенілаланінгідроксилази.



Катаболізм надлишку ароматичних амінокислот в гепатоцитах в нормі полягає в трансамінуванні тирозину і перетворенні на п-оксифенілпіруват, який під дією п-гідроксифенілпіруватдиоксидази та вітаміну С окиснюється до гомогентизинової кислоти, котра окислюється до фумарилацетоацетату (фермент – диоксидаза гомогентизинової кислоти), а ос-танній за участі фумарилацетоацетази розщеплюється до фумарату та ацетоацетату. Схема катаболізму тирозину – на наступній сторінці.

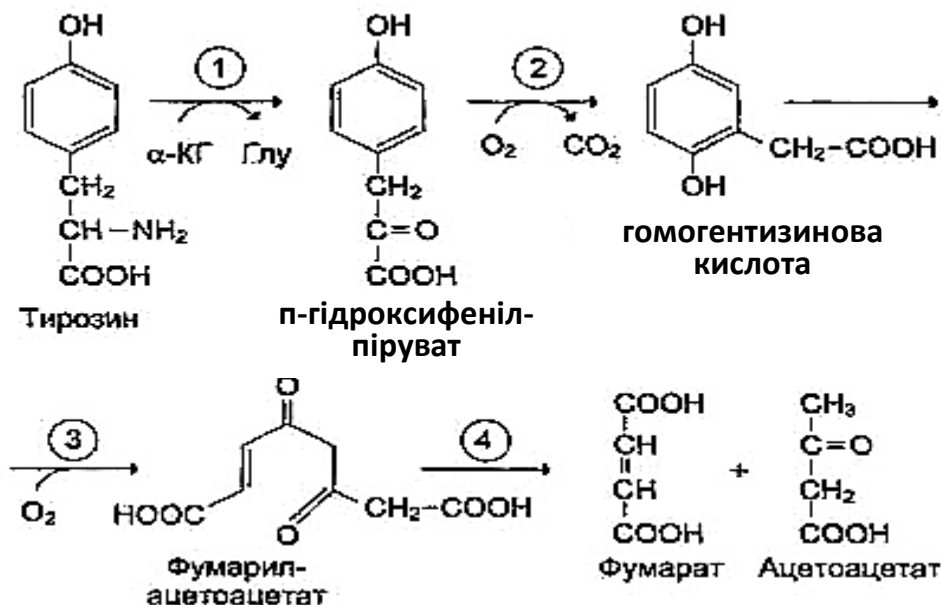
Генетично детерміновані дефекти ензимів, які забезпечують катаболізм тирозину є причинами розвитку різних типів тирозинозів і охронозу (алкаптонури):

- тирозиноз I типу – дефект п-гідроксифенілпіруватдиоксидази (2)
- тирозиноз II типу – дефект трансамінази (1)

тирозиноз III типу – дефект фумарилацетоацетази (4)

охроноз – дефект диоксидази гомогентизинової кислоти (3).

Прояви тирозинозів: відкладення в тканинах кристалів тирозину (II тип) через перевищення меж його розчинності або його метаболітів (I та III типи) – помутніння рогівки, гіперкератоз шкіри долонь і підшов; токсична дія патологічних метаболітів (п-гідроксифенілпіруват, п-гідроксифенілліктат, п-гідроксифенілацетат, сукцинілацетон) – гепатоспленомегалія, цироз, карцинома печінки, остеопороз, пронос, блювота, «капустяний» запах, помірна розумова відсталість. Рівень фенілаланіну в крові не підвищується (проявів фенілкетонурії немає!), оскільки реакція гідрокилювання фенілаланіну (утворення тирозину) не порушена і вона не зворотня.

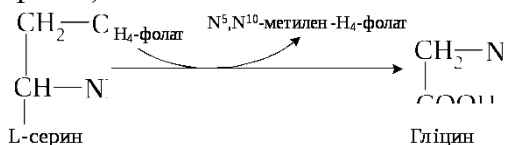


Прояви охронозу. Надлишок гомогентизинової кислоти відкладається в сполучній тканині, особливо в шкірі і хрящах. Окислюючись, вона полімеризується з утворенням темно-коричневого пігменту (*грец.* ochros – темно-жовтий, posos – хвороба). Накопичуючи пігмент, тканини (особливо, склери, хрящі вушних раковин, слизові) набувають відповідного забарвлення; акумуляція гомогентизинату в тканинах суглобів призводить до розвитку артритів. Просочені пігментом ділянки в подальшому нерідко кальцифікуються. Характерним проявом захворювання є надмірне виділення гомогентизинової кислоти із сечею, яка при додаванні лугів набуває темного забарвлення (*грец.* als – сода, apto – схвачувати і uron – сеча) – алкаптонурия.

Обмін гліцину та серину. В організмі людини і тварин гліцин утворюється з серину або треоніну (при його розщепленні на ацетальдегід і гліцин), а також при деметилюванні саркозину (метилгліцину), холіну і низки інших речовин. Гліцин входить у склад гормону інсуліну, білка щитоподібної залози – тиреоглобуліну, альбумінів і глобулінів сироватки крові, гемоглобіну, ферменту пепсину, казеїногену молока, кератину волосся, білка сполучної тканини колагену та інших. В організмі людини гліцин використовується для біосинтезу парних жовчних кислот (глікохолевої, глікодезоксихолевої), екстрактивної речовини м'язів – креатину, виконує важливу роль в окиснювально-відновних процесах. При окиснювальному дезамінуванні і взаємодії з напівальдегідом глютамінової кислоти гліцин перетворюється в гліоксильову кислоту, а напівальдегід – в орнітин. Гліоксильова кислота в свою чергу перетворюється в оксалатну і в подальшому в мурашину. Остання окиснюється до CO₂ і H₂O або використовується для синтезу вуглеводів. Гліцин також необхідний для знешкодження в печінці продуктів гниття білків, які всмокталися з кишки. Загальна схема біохімічних перетворень гліцину показана на наступній сторінці.

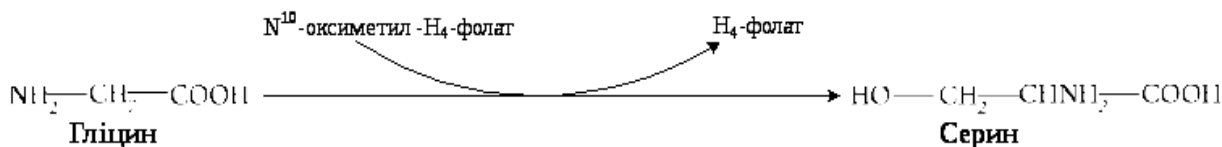
Гліцин в організмі синтезується з амінокислоти серину, вуглецевий скелет якої утворюється з глюкози через проміжну реакцію утворення 3-фосфо-гліцерату, а амінну групу отримує від глютамату. Реакція синтезу гліцину із серину каталізується ферментом

сериноксиметилтрансферазою, коферментом якої є активна форма вітаміну B₉ – тетрагідрофолієва кислота (H₄-фолат).

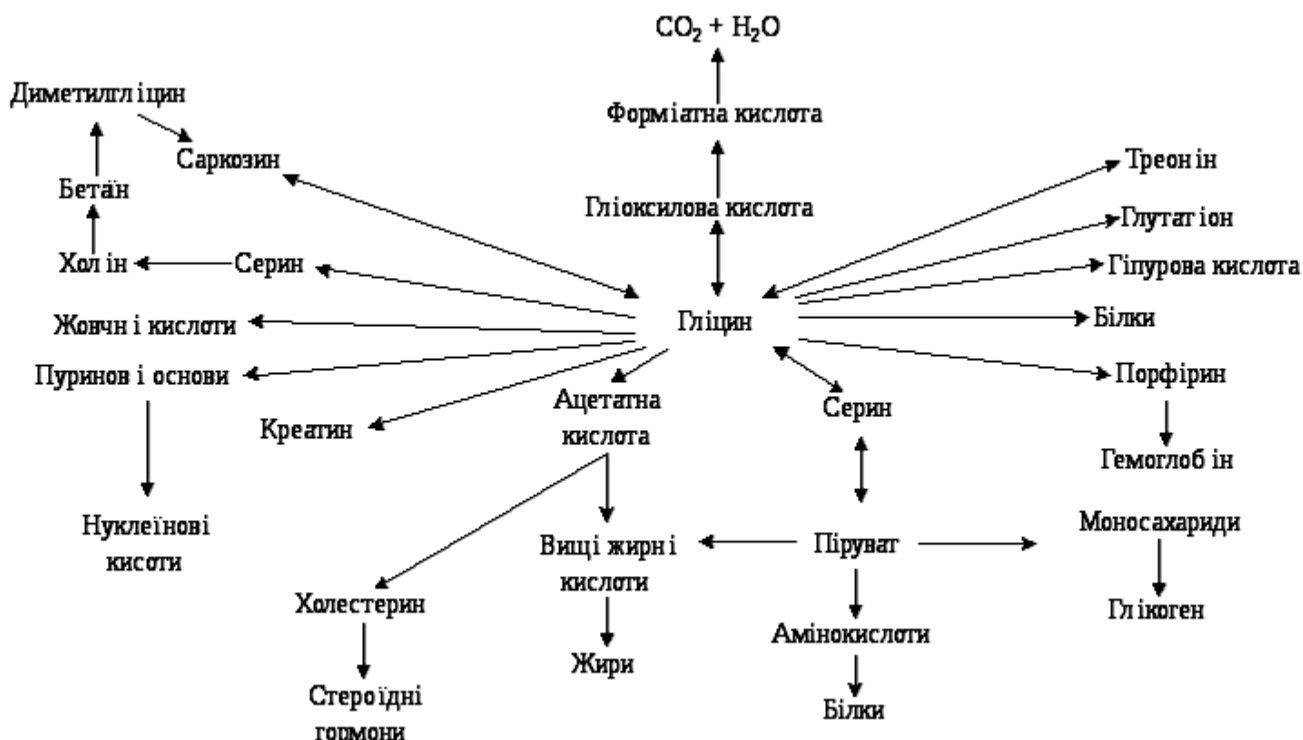


Далі відбувається окиснення гліцину до діоксиду вуглецю та аміаку, в якому також приймає участь тетрагідрофолієва кислота (акцептор метиленової групи).

З гліцину може знову синтезуватися серин, а з серину шляхом дезамінування – пірвіноградна кислота, яка потім вступає в низку реакцій розщеплення чи біосинтезу вуглеводів.



Загальна схема біохімічних перетворень гліцину



Особливе значення реакцій катаболізму серину і гліцину полягає в тому, що вони супроводжуються утворенням однувглецевого метиленового фрагменту (–CH₂–).

Роль проміжних переносників (донорів) однувглецевих фрагментів в процесах біосинтезу багатьох сполук відіграють похідні H₄-фолату (наприклад, синтез пуринових основ і тимідилової кислоти, необхідних для утворення ДНК і РНК, відновлення метіоніну, синтез холіну і т.д.). Причому метиленовий фрагмент в молекулі H₄-фолату може перетворюватися на інші однувглецеві групи: метенільну (–CH=), метильну (–CH₃), формільну (–HC=O) і форміміногрупу (–CH=NH).

Перетворення фолієвої кислоти на активну тетрагідрофолієву кислоту відбувається в печінці в декілька стадій шляхом відновлення при участі НАДФ-Н-залежних редуказ: **фолатредуктази**, що утворює 7,8-дигідрофолієву кислоту (H₂-фолат) та **дигідрофолатредуктази**, при дії якої синтезується 5,6,7,8-тетрагідрофолат (H₄-фолат).

Фізіологічно активні сполуки, які інгібують дигідрофолатредуктазу, а, отже, і біосинтетичні реакції за участю Н₄-фолату, застосовуються як протипухлинні засоби. Так, наприклад, метотрексат і аміноптерин затримують поділ клітин злоякісних пухлин, блокуючи синтез тимідилату, оскільки, маючи подібність до частини молекули фолієвої кислоти, діють в біохімічних реакціях як її структурні аналоги і, в зв'язку з чим, гальмують регенерацію Н₄-фолату.

Обмін триптофану та його спадкові порушення. Триптофан належить до незамінних амінокислот для організму людини та вищих тварин у зв'язку з відсутністю ферментних систем синтезу його вуглецевого скелета. Разом з цим, триптофан є попередником в біосинтезі таких фізіологічно активних сполук, як серотонін, мелатонін та нікотинова кислота (вітамін РР), який синтезується в організмі одразу в формі коферменту НАД. Відомо, що нестача триптофану в харчовому раціоні прискорює розвиток захворювання, яке називається *пелагрою* і пов'язане з дефіцитом саме вітаміну РР. В цих випадках добавка триптофану в дієту покращує стан хворого і сприяє послабленню авітамінозу.

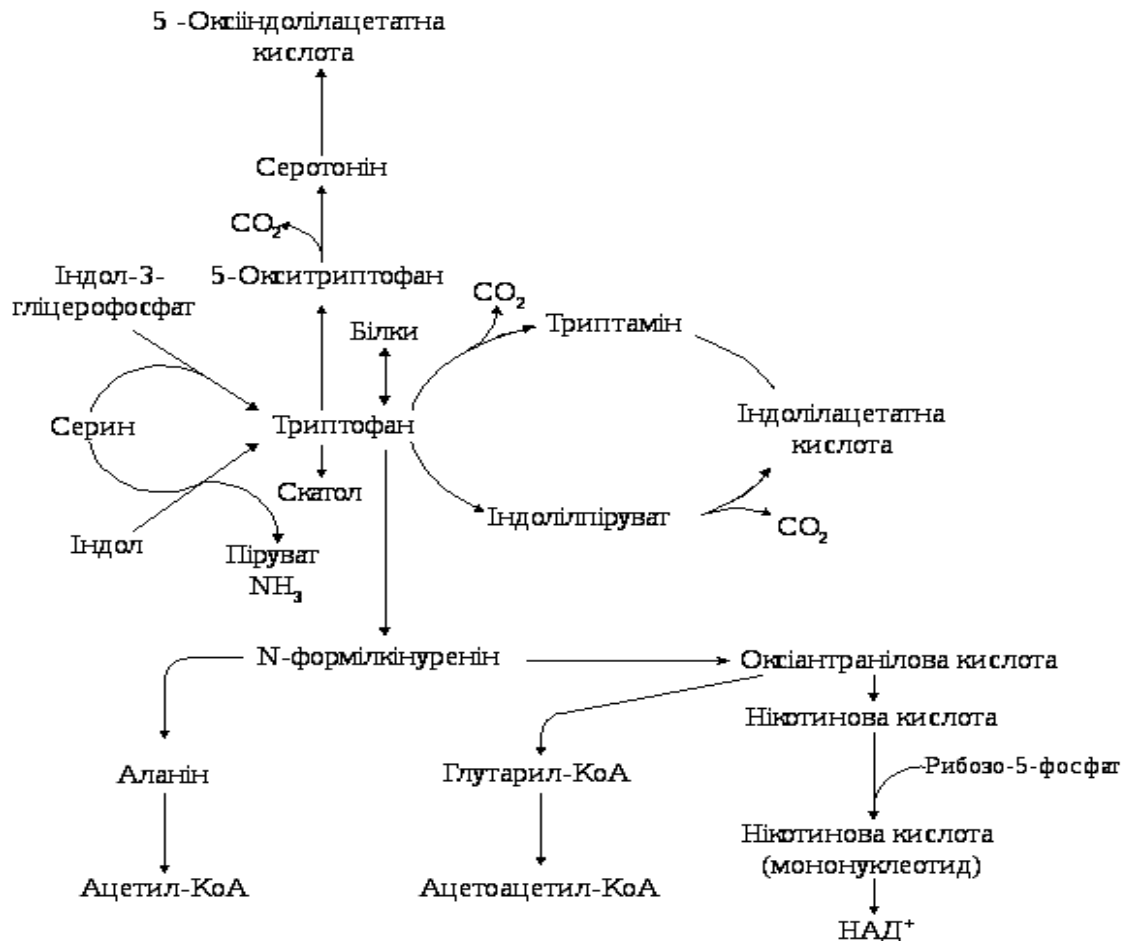
Існують два основні біохімічні шляхи перетворення триптофану:

– серотоніновий шлях, що становить в кількісному відношенні приблизно 1% загальної кількості триптофану в організмі;

– кінуреніновий шлях, по якому метаболізується понад 95% ендogenous триптофану.

Включення триптофану в серотоніновий шлях починається з його гідроксилування до 5-окситриптофану, який після декарбоксилування перетворюється на серотонін. В організмі людини серотонін підлягає окиснювальному дезамінуванню з утворенням оксиіндолацетатної кислоти, яка виділяється з сечею. Екскреція оксиіндолацетату значно збільшена при карциноїдному синдромі, коли за серотоніновим шляхом перетворюється до 60% триптофану.

Катаболізм триптофану кінуреніновим шляхом починається з окиснення триптофану при дії гемвмісного ферменту триптофанпіролази до формілкінуреніну, який після відщеплення мурашиної кислоти перетворюється на кін-уренін та 3-оксикінуренін. Подальші перетворення 3-оксикінуреніну пов'язані з дією ПАЛФ-залежного ферменту кінуренінази, яка розщеплює його до аланіну та 3-оксіантранілової кислоти. Остання після складних багатоступеневих перетворень призводить до хінолінової кислоти – попередника в синтезі нікотин-аміду в формі коферменту НАД. Нижче представлена схема обміну триптофану.



При декарбоксілюванні триптофану утворюється біологічноактивний амінокислотний триптамін. Дезамінуючись, він перетворюється в індолілоцтовий альдегід, а потім окиснюється в індолілацетатну кислоту – один із кінцевих продуктів обміну триптофану. В товстій кишці під впливом мікроорганізмів із триптофану синтезується індол і скатол, які в печінці знешкоджуються і в вигляді парних сполук виділяються з сечею.

Порушення обміну триптофану – *хвороба Хартнупа* викликається специфічними порушеннями обміну цієї амінокислоти. Метаболічний дефект пов'язаний із вродженим порушенням всмоктування триптофану в кишечнику і реабсорбції триптофану та продуктів його обміну в нирках. Основними проявами захворювання (через великі втрати триптофану з сечею та нестачу нікотинової кислоти) є дерматит, кишкові (діарея) та психічні розлади (деменція, атаксія), часто спотерігається гіпераміноацидурія.

Обмін цистеїну та цистину. Обмін цистеїну може відбуватися кількома шляхами. Схема обміну цистеїну та цистину представлена на схемі нижче.

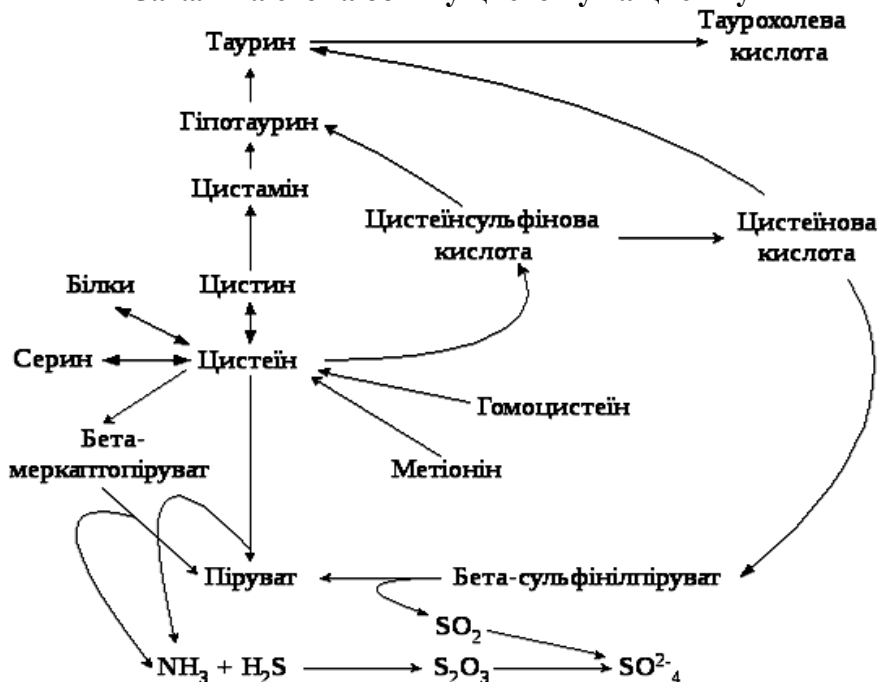
Окиснюючись, цистеїн перетворюється на цистеїнову кислоту. Проміжними продуктами окиснення виступають цистеїнсульфенова і цистеїнсульфінова кислоти. Цистеїнсульфінова кислота в реакції трансамінування з α -кетоглутаратом може перетворюватись на β -суль-фінілпіруват, а потім на піруват. Останній використовується для біосинтезу глікогену або піддається окиснювальному декарбоксілюванню до ацетил-КоА, який, в свою чергу, окислюється в циклі трикарбонних кислот до CO_2 і H_2O або включається в біосинтез вищих жирних кислот, стероїдних гормонів та інших речовин.

Цистеїнова та цистеїнсульфінова кислоти в печінці декарбоксілюються, перетворюються на таурин, який, разом з гліцином, використовується в організмі для утворення кон'югованих форм жовчних кислот – *глікохолевої* та *таурохолевої*.

Таурин знижує рівень холестерину в крові при атеросклерозі, підвищує синтез жовчних кислот в печінці. Його можна застосувати з лікувальною метою при захворюваннях серця, печінки при атеросклерозі, алкогольних інтоксикаціях і хімічних отруєннях. Він також виявляє протипроменеву лікувальну дію, сприяючи нормалізації обміну речовин.

Таким чином, обмін цистеїну виступає одним із ланцюгів взаємозв'язку обміну білків з обміном вуглеводів і ліпідів.

Загальна схема обміну цистеїну та цистину



Обмін метіоніну. Метіонін – незамінна амінокислота, що бере участь у внутрішньоклітинному метаболізмі і є донором метильної ($-\text{CH}_3$) групи в численних реакціях метилування. Метіонін синтезується в організмі з амінокислоти гомоцистеїну. Донором метильної групи в цій реакції є активна форма фолієвої кислоти – N^5 -метилтетрагідрофолат. Фермент, що каталізує цю реакцію – *гомоцистеїнметилтрансфераза*, його коензимом є коферментна форма вітаміну B_{12} – *метилкобаламін*.

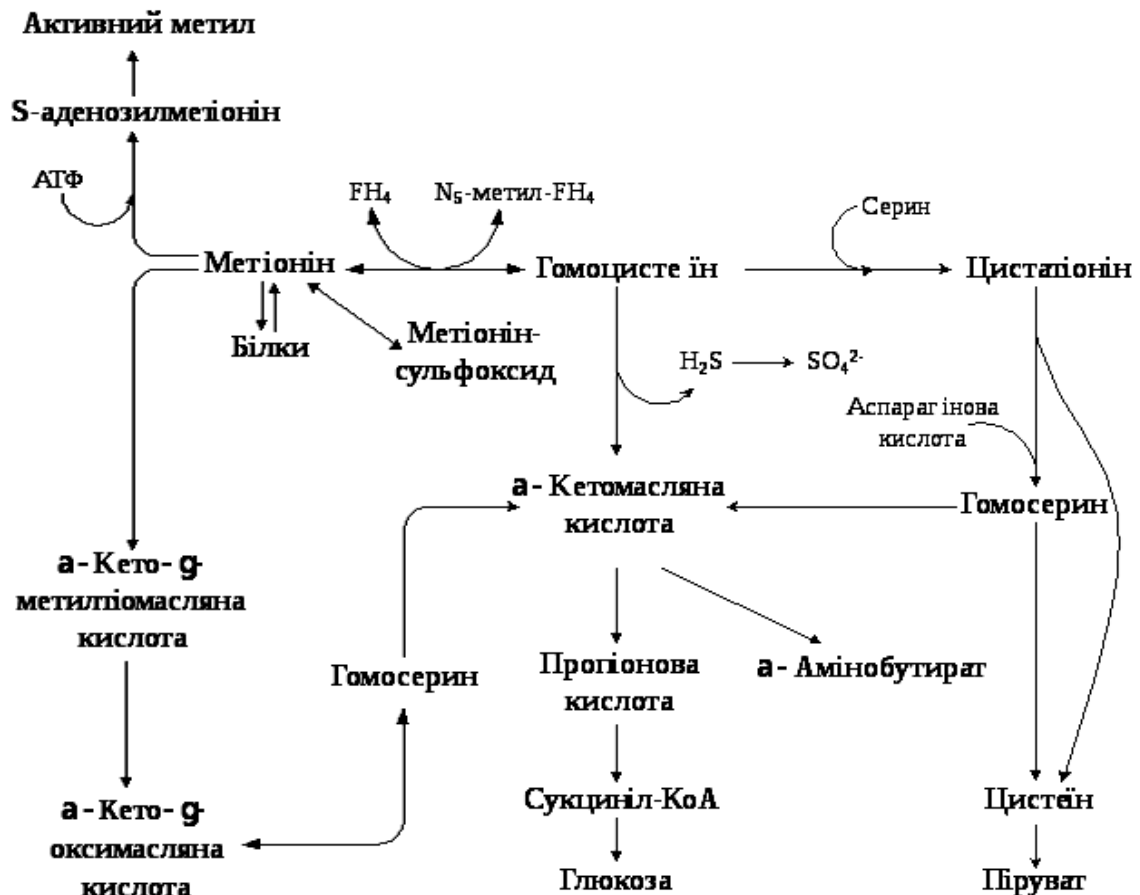
Біохімічно активною формою метіоніну, тобто безпосереднім донором ($-\text{CH}_3$) групи в реакціях трансметилування, є *S*-аденозилметіонін, який синтезується в організмі людини з метіоніну при дії ферменту *метіонінаденозилтрансферази* за участі АТФ.

S-аденозилметіонін виступає джерелом метильних груп креатинфосфату – важливої макроергічної сполуки м'язів, гормону мозкової речовини наднирників – адреналіну, кінцевого продукту обміну нікотинової кислоти – *N*-метилнікотинаміду, гормону епіфізу – мелатоніну і ряду інших сполук (азотистих основ деяких нуклеотидів, зокрема тиміну).

S-аденозилметіонін, що втрачає активну метильну групу в реакціях метилування біомолекул, перетворюється на *S*-адинозилгомоцистеїн, а далі на гомоцистеїн і знову на метіонін. Крім цього, гомоцистеїн може бути донором сірки для синтезу цистеїну і цистину. Оскільки відбувається втрата метіоніну в карболітичних реакціях (через утворення сукциніл-КоА), функціонування циклу «активного метилу» залежить від постійного надходження метіоніну як незамінної амінокислоти з їжею.

При конденсації гомоцистеїну з серином утворюється цистатіонін, який гідролізується на гомосерин і цистеїн. В організмі людини гомоцистеїн синтезуватися не може, тому не може утворюватися і метіонін, оскільки гомоцистеїн перетворюється в

метіонін за рахунок приєднання метильної групи. Основні шляхи обміну метіоніну та гомоцистеїну представлені на схемі нижче.



Окиснюючись, гомоцистеїн перетворюється на гомоцистин або гомоцистеїнову кислоту. Втрачаючи сірку і дезамінуючись, гомоцистин перетворюється в кетомасляну кислоту; при цьому утворюється сірководень і аміак.

Сірководень далі окиснюється до сульфатної кислоти, аміак використовується для синтезу сечовини або включається в інші реакції. Крім цього, гомоцистеїн може знову метилуватися з утворенням метіоніну. При дезамінуванні шляхом переамінування з α-кетоглутаровою кислотою метіонін перетворюється в метиліомасляну кислоту, з якої може утворюватися метилмеркаптан ($\text{CH}_3\text{-SH}$). В підвищених кількостях метилмеркаптан утворюється і виділяється з сечею та видихається з повітрям при деяких захворюваннях печінки.

Дослідами з метіоніном, міченим за вуглецем CH_3 -групи, встановлено, що частина його метильних груп окиснюється до CO_2 і H_2O .

Глутатіон – синтез і біологічні функції. Глутатіон (γ-глутамініл–цистеїніл–гліцин) є трипептидом, що в своєму складі містить вільну сульфгідрильну групу.



Синтез глутатіону включає дві реакції і відбувається в цитоплазмі кожної клітини, але головним постачальником для організму є печінка. В першій реакції за участі γ-глутамілцистеїнсинтетази, іонів магнію і калію утворюється γ-глутамілцистеїн. Друга реакція (приєднання до утвореного дипептиду гліцину) відбувається за участі ферменту глутатіонсинтетази, іонів магнію і АТФ.

В органах, тканинах і біологічних рідинах глутатіон знаходиться в двох формах: відновленій (97-99%) та окисненій. Він може перетворюватися з відновленої (Г-SH) на окиснену (Г-S-S-Г) форму.

Його біохімічна функція в організмі пов'язана з відновленням (детоксикацією) органічних пероксидів – гідрпероксида (R-O-O-H) та алкілпероксида (R-O-O-R), що утворюються внаслідок діоксигеназних реакцій безпосереднього включення атома кисню в біомолекули, внаслідок вільнорадикальних реакцій, субстратом яких є ненасичені жирні кислоти мембранних фосфоліпідів. Активація цих процесів спостерігається при дії на організм іонізуючої радіації, чужорідних сполук – *ксенобіотиків*. До сполук, що протидіють цим процесам, крім глутатіону, відносять вітамін Е, аскорбінову кислоту, урати, каротини.

При взаємодії глутатіону з гідрпероксидом утворюються нешкідливі органічні спирти, які підлягають подальшому окисненню. Реакція каталізується ферментом *глутатіонпероксидазою*, яка містить в активному центрі атом селену (Se). Цей ензим присутній в усіх органах і тканинах людини.

Зворотне відновлення Г-S-S-Г до Г-SH каталізується НАДФН-залежною *глутатіонредуктазою*. Цей процес спряжений з окисненням глюкозо-6-фосфату та 6-фосфоглюконату в пентозофосфатному циклі, що, в свою чергу, забезпечує утворення НАДФ-Н, необхідного для відновлення окисненого глутатіону вказаним ферментом. Участь глутатіону в знешкодженні гідрпероксидів та його відновлення показані на схемі.

Відновлений глутатіон є головним джерелом відновлених еквівалентів для регуляції окиснювального статусу всередині клітини. Внутрішньоклітинна концентрація відновленого глутатіону складає 0,5-10 ммоль, тоді як для плазми (сироватки) крові характерна мікромольна концентрація.

Наявність в організмі двох форм глутатіону (відновленої та окисненої) створює найважливішу редокс-систему, яка захищає його від токсичної дії різноманітних пероксидів, у тому числі і від пероксиду водню. Найактивніше цей процес відбувається в еритроцитах.

Відновлювальний цикл глутатіону відіграє роль в багатьох метаболічних і фізіологічних функціях: стабілізації клітинних мембран, синтезі і розпаді білків, активації та інактивації ферментів, відновленні цистину і дегідроаскорбінової кислоти. Аскорбінова кислота є другим за значенням цитозольним відновником. Її окиснення призводить до утворення дегідроаскорбінової кислоти, яка є сильним цитотоксином. Ферментативне її відновлення *глутатіонаскорбатредуктазою* до аскорбінової кислоти відбувається за участі відновленого глутатіону.

Непряма участь відновленого глутатіону в ферментативному каталізі зумовлена підтриманням у відновленому стані сульфгідрильних груп цих ферментів.

Відновлений глутатіон реагує з багатьма ксенобіотиками з утворенням глутатіонових кон'югатів. Процес відбувається в декілька етапів. Перший етап глутатіонової кон'югації відбувається в печінці, наступні – в нирках. Швидкість утворення глутатіонових кон'югатів визначається активністю глутатіотрансферази і залежить від рівня в організмі відновленого глутатіону. Глутатіотрансферази виявлені у всіх клітинах організму, в основному, в їх цитозолі та в незначних кількостях – у мікросомах і мітохондріях.

Глутатіонова кон'югація пов'язана не тільки з детоксикацією ксенобіотиків, але й з ендогенними метаболітами, які мають електрофільні центри. Виявлена глутатіонова кон'югація естрадіолу, простагландинів, лейкотрієнів, білірубину, етанолу.

Під дією радіації спостерігається окиснення тіолових груп клітин, зниження рівня внутрішньоклітинної концентрації відновленого глутатіону. Радіорезистентність клітин організму залежить, в першу чергу, від рівня відновленого глутатіону. Стимулюючи біосинтез відновленого глутатіону лікарськими речовинами або використовуючи екзогенний глутатіон, можна посилити захист клітин від іонізуючого опромінення.

При порушенні обміну глутатіону, дефіциті активності глутатіонредуктази чи глутатіонпероксидази порушується відновлювальний потенціал еритроцита і знешкодження пероксидів. Утворені при окисненні гемоглобіну його деривати формують гранули, відомі під назвою тілець Гейца, що в подальшому призводить до підвищення проникності мембрани еритроцита, яке спричинює зростання кількості іонів натрію і води в еритроциті та його гемоліз.

Еритроцитарні ензимопатії, які пов'язані з обміном глутатіону, утворюють загальну групу близьких за клінічною картиною захворювань, головним чином, хронічну несфероцитарну гемолітичну анемію та гостру гемолітичну медикаментозну анемію.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Шляхи метаболізму фенілаланіну і тирозину, їх генетичні порушення.
2. Обмін гліцину та серину. Роль активних форм фолієвої кислоти.
3. Обмін триптофану та його порушення.
4. Обмін цистеїну, метіоніну. Глутатіон: структура, біосинтез, функції в організмі.

5.2 САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Після обробки сечі немовляти розчином $FeCl_3$ з'являється зелене забарвлення. Укажіть, порушенню обміну якої амінокислоти це відповідає:

- A. Гістидину
- B. Цистеїну
- C. Фенілаланіну
- D. Глутаміну
- E. Лізину

2. Укажіть фермент, спадковий дефект якого є причиною фенілкетонурії:

- A. Тирозиназа
- B. Аспаргатамінотрансфераза
- C. Фенілаланінгідроксилаза
- D. Гексокіназа
- E. Піруватдекарбоксилаза

3. В сечі пацієнта визначена фенілпіривиноградна кислота. Укажіть, наслідком порушення якого обміну це є:

- A. Фосфорно-кальцієвого
- B. Ліпідного
- C. Обміну амінокислот
- D. Вуглеводного
- E. Водно-сольового

4. Альбіноси не переносять вплив сонця, у них швидко з'являються опіки. Укажіть порушення метаболізму, яке лежить в основі цього явища:

- A. Руйнування меланіну
- B. Порушення транспорту холестерину
- C. Відсутність тирозинази
- D. Порушення гідроксилювання холестерину
- E. Руйнування вітаміну D_3

5. В лікарню доставлена дворічна дитина зі сповільненим розумовим та фізичним розвитком, яка страждає від часткої блювоти після вживання їжі. В сечі

знайдена фенілпірвіноградна кислота. Наслідком порушення якого обміну є ця патологія?

- A. Ліпідного обміну
- B. Обміну амінокислот
- C. Вуглеводного обміну
- D. Водно-сольового обміну
- E. Фосфорно-кальцієвого обміну

6. У хворого з діагнозом «злоякісний карциноїд» різко підвищений вміст серотоніну в крові. З якої амінокислоти може утворитися цей біогенний амін?

- A. Треоніну
- B. Метіоніну
- C. Аланіну
- D. Триптофану
- E. Лейцину

7. Метильна група (-CH₃) використовується в організмі для синтезу таких важливих сполук як креатин, холін, адреналін тощо. Яка з незамінних амінокислот є джерелом цієї групи?

- A. Валін
- B. Лейцин
- C. Триптофан
- D. Ізолейцин
- E. Метіонін

8. До лікаря звернувся хворий зі скаргами на опіки шкіри та порушення зору як результат дії сонячної радіації. Попередній діагноз: альбінізм. Порушення обміну якої амінокислоти спостерігається у цього хворого?

- A. Пролін
- B. Триптофан
- C. Аланін
- D. Тирозин
- E. Лізин

9. Педіатр при огляді дитини відмітив відставання у фізичному та розумовому розвитку. В сечі різко підвищений вміст кетокислоти, яка дає якісну кольорову реакцію з хлорним залізом. Яке порушення обміну речовин було знайдено?

- A. Цистинурія
- B. Тирозинемія
- C. Фенілкетонурія
- D. Алкаптонурія
- E. Альбінізм

10. Хлопчик 13 років скаржиться на загальну слабкість, запаморочення, стомлюваність. Відмічено відставання в розумовому розвитку. При обстеженні виявлена висока концентрація валіну, ізолейцину, лейцину в крові та сечі. Сеча зі специфічним запахом. Який найбільш вірогідний діагноз?

- A. Хвороба "кленового сиропу"
- B. Гістидинемія
- C. Тирозиноз
- D. Базедова хвороба
- E. Хвороба Адісона

11. У грудної дитини спостерігається забарвлення склер, слизових оболонок. Виділяється сеча, яка темніє на повітрі. В крові та сечі виявлена гомогентизинова кислота. Що є причиною цього стану?

- A. Цистинурія
- B. Гістидинемія
- C. Алкаптонурія
- D. Галактоземія
- E. Альбінізм

12. Немовля відмовляється від годування груддю, збуджене, дихання неритмічне, сеча має запах «пивної закваски» або «кленового сиропу». Уроджений дефект якого ферменту визвав дану патологію?

- A. Дегідрогеназа розгалужених альфа-кетокислот
- B. Аспаратамінотрансфераза
- C. УДФ-глюкуронілтрансфераза
- D. Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа
- E. Гліцеролкіназа

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 12

1. ТЕМА: Ензимодіагностика. Роль ферментів плазми крові (АЛТ, АСТ, КФК, ЛДГ, фосфатаз) та методи визначення їх активності

2. АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ: Тканини людини характеризуються специфічним ферментним і ізоферментним спектром. Існує градієнт концентрації ферментів між внутрішньоклітинними і позаклітинними частинами тіла. Тому будь-які, навіть незначні, пошкодження клітин (іноді функціональні розлади) призводять до виділення ферментів в позаклітинний простір, звідки вони надходять в кров. Підвищення рівня внутрішньоклітинних ферментів у плазмі крові напряду залежить від природи шкідливого впливу, часу дії та ступеня пошкодження біомембран клітин і субклітинних структур органів. Дуже істотним для правильної діагностики є знання особливостей розподілу ферментів в органах і тканинах, а також їх внутрішньоклітинної локалізації.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичний матеріал з ензимодіагностики та навчитись практично визначати активність ферментів в сироватці крові.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Медична ензимологія – це самостійна галузь медичної біохімії, що вивчає роль ферментів в забезпеченні нормальної життєдіяльності організмів і розвитку патологічних станів, а також можливості їх використання в якості діагностичних і лікувальних засобів. Теоретичні аспекти медичної ензимології зводяться, в основному, до з'ясування найбільш повної і достовірної картини етіології і патогенезу захворювань, тобто в кінцевому підсумку до пізнання молекулярних механізмів порушень метаболічних процесів. Медична ензимологія має свої цілі і завдання, специфічні методології, етичні підходи і методи дослідження. Вона розвивається за трьома головними напрямками: ензимопатологія, ензимодіагностика і ензимотерапія.

Ензимопатологія – це теоретична і експериментальна частина ензимології, що вивчає молекулярні основи розвитку патологічного процесу, виходячи з даних про порушення механізмів регуляції активності або синтезу одного чи групи ферментів. Ферментні порушення в тій чи іншій мірі супроводжують будь-який патологічний процес. Найбільш яскравим прикладом є спадкові ензимопатії – генетично обумовлені дефекти біосинтезу певного ферменту в результаті мутації відповідного гена, що призводить до порушень певної ланки метаболізму. Дефектний фермент неактивний взагалі або проявляє лише частину властивої йому активності, оскільки характерні для нього значення К_m і

У них не відповідають нормі. Більшість спадкових ензимопатій супроводжується накопиченням патологічних проміжних продуктів обміну.

Сучасна ензимодіагностика розвивається в двох головних напрямках. Перший – це використання ферментів як реагентів для кількісного визначення нормальних чи аномальних хімічних речовин в сироватці крові, сечі, шлунковому соку і т.п. Інший шлях – це кількісне визначення самих ферментів в біологічних рідинах. Ферментні тести вигідно відрізняються від інших хімічних діагностичних тестів, які використовуються в клініці, високою чутливістю і специфічністю. Відомо близько 20 тестів, заснованих на кількісному визначенні активності ферментів і ізоферментів. В практичному плані ензимологічні тести допомагають в ранній постановці і диференціації діагнозу, інформують про хід та можливий результат хвороби, а також адекватності та ефективності лікування. Два перспективні напрямки подальшого розвитку діагностичної ензимології – це раціональна модифікація вже випробуваних методик та пошук нових органоспецифічних (тканинспецифічних) ферментів і ізоферментів.

Класифікація ферментів плазми (сироватки) крові:

1. **Секреторні ферменти**, синтезуючись, головним чином, в печінці, в нормі виділяються в плазму крові, де відіграють певну фізіологічну роль (ферменти, що беруть участь в процесах згортання крові, холінестераза, церулоплазмін). При важких порушеннях функцій печінки активність ферментів в плазмі крові знижується.

2. **Екскреторні ферменти** (лужна фосфатаза, гама-глутамілтранспептидаза, амілаза, трипсин, ліпаза, еластаза та ін.) в фізіологічних умовах в основному виділяються в просвіт ШКТ. При порушенні виділення активність екскреторних ферментів в плазмі крові підвищується.

3. **Індикаторні ферменти** виконують в тканинах певні внутрішньо-клітинні функції. Більша їх частина в сироватці крові визначається в невеликій кількості. При ураженні тих або інших тканин активність індикаторних ферментів в сироватці крові різко зростає.

Кожен орган в організмі має певний спектр ферментів. Його характеристикою може бути більш-менш типова група ферментів, тобто характерна ензиматична констеляція.

Ферменти мають різну внутрішньоклітинну локалізацію: одні з них зосереджені в цитоплазмі (лактатдегідрогеназа, альдолаза), другі – в мітохондріях (глутаматдегідрогеназа), треті – в лізосомах (β -глюкуронідаза, кисла фосфатаза), четверті – в мембрані клітин (γ -глутамілтрансфераза) і т.д. Врахування цього фактору при клінічному оцінюванні результатів визначення активності ферментів має велике діагностично-прогностичне значення.

Ізоферменти – це молекулярні форми одного і того ж ферменту, що виникли в результаті невеликих генетичних відмінностей в його первинній структурі. Вони визначають швидкість і направлення ферментативної реакції завдяки їх різній спорідненості до субстрату.

Так наприклад, лактатдегідрогеназа – це гетеротетрамер, що ключає дві різних субодиниці Н – heart і М – muscle в певних сполученнях, і таким чином має п'ять ізоферментів – ЛДГ-1, ЛДГ-2, ЛДГ-3, ЛДГ-4 і ЛДГ-5.

ЛДГ-1 (H4) і ЛДГ-2 (H3M1), які присутні в тканинах з аеробним характером обміну (міокард, мозок, корковий шар нирок), мають високу спорідненість до лактату, перетворюючи його в піруват, а ЛДГ-4 (H1M3) і ЛДГ-5 (M4) – в тканинах з анаеробним характером обміну (печінка, м'язи), мають низьку спорідненість до лактату

Фермент креатинкіназа – гетеродимер, представлений трьома ізоферментними формами, складеними з двох типів субодиниць: М (muscle) і В (brain) – КФК-ММ (мязова форма), КФК-МВ (міокардіальна форма) і КФК-ВВ (мозкова форма).

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Медична ензимологія: складові частини, цілі, значення.
2. Класифікація ферментів плазми крові, їх використання при діагностиці захворювань. Поняття про ізоферменти та їх діагностичне значення.
3. Визначення активності трансаміназ (АЛТ, АСТ) у сироватці крові. Уніфікований метод Райтмана-Френкеля. Кінетичні методи визначення активності амінотрансфераз.
4. Клініко-діагностичне значення та методи визначення активності γ -глутамілтрансферази в сироватці крові.
5. Визначення активності ізоферментів ЛДГ в сироватці крові.
6. Клініко-діагностична роль визначення ізоферментів КФК.
7. Визначення активності α -амілази в сироватці крові та сечі.
8. Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові.

5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол № 12

Дата:

1. Визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові.

Принцип методу:

В результаті переамінування аланіну й альфа-кетоглутарату, що відбувається під дією АЛТ, утворюються глутамінова й піровиноградна кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі утворюється забарвлений розчин гідразону пірувату, інтенсивність забарвлення якого пропорційна активності фермента. Оптичну щільність розчину визначають фотокolorиметрично.

Хід роботи:

Готують реакційні суміші у відповідності з представленою нижче таблицею.

Вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти контрольної при 490-540 нм (світло-зелений світлофільтр) у кюветах 10 мм. Розрахунок активності фермента проводять за калібрувальним графіком.

В сироватці крові здорових людей активність АЛТ складає 5-30 од/мл або 0,1-0,7 мкм/мл в 1 годину.

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Інкубація 3 хвилини при 37 ⁰ С		
Стоп реагент	-	0,5
Сироватка крові	0,1	0,1
Інкубація 30 хвилин при 37 ⁰ С		
Стоп реагент	0,5	-
Інкубація 20 хвилин при кімнатній температурі		
0,4 N NaOH	5	5
Інкубація 10 хвилин при кімнатній температурі		

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення (мМ/л)
1			
2			

3			
4			
5			
6			

Висновки:

Клініко-діагностичне значення:

Визначення активності АЛТ широко використовується для діагностики захворювань серця й печінки. При хворобі Боткіна (ще в переджовтняничний період) значно зростає активність АЛТ. Зміни активності, як правило, відображають ступінь поразки печінкової паренхіми. Збільшується активність АЛТ при загостренні хронічного гепатиту, при токсичній поразці паренхіми печінки.

Підвищення активності АЛТ має місце також при гострому інфаркті міокарда. Однак це підвищення не настільки різке в порівнянні зі змінами активності АСТ. При інфаркті міокарда активність АСТ підвищується вже через 4-6 годин після виникнення гострого болювого приступу та тримається високою протягом 3-7 днів. Тому одночасне визначення активності двох сиваткових амінотрансфераз є цінним діагностичним тестом. **В нормі співвідношення активностей АСТ/АЛТ (коефіцієнт де Рітіса) дорівнює $1,33 \pm 0,42$.** У хворих інфекційним гепатитом відбувається зниження коефіцієнта, а при гострому інфаркті міокарда величина цього коефіцієнта, навпаки, різко зростає.

2. Кількісне визначення активності АСТ в сироватці крові.

Принцип методу:

В результаті амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, яка відбувається під дією аспаратамінотрансферази, утворюються L-глутамат та щавелевооцтова кислоти, яка спонтанно декарбоксилюється з утворенням піровиноградної кислоти. При додаванні 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі утвориться забарвлений розчин гідразону пірувату, інтенсивність забарвлення якого пропорційна активності ферменту.

Готують реакційні суміші у відповідності зі схемою:

Відміряти в пробірці, мл	Дослідна проба	Контрольна проба
Субстратно-буферний розчин	0,5	0,5
Інкубація 3 хвилини при 37 °С		
Стоп реагент	-	0,5
Сировотка крові	0,1	0,1
Інкубація 10 хвилин при 37 °С		
Стоп реагент	0,5	-
Інкубація 20 хвилин при кімнатній температурі		
0,4н NaOH	5	5
Інкубація 10 хвилин при кімнатній температурі		

Вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти вільної при 490-540 нм у кюветах 10 мм. Розрахунок активності ферменту проводять за графіком.

Активність АсАТ в сироватці в нормі складає 0.1-0.45 мкм/мл в годину.

Заповнити таблицю

№ п/п	№ зразка	Оптична щільність	Абсолютне значення (мМ/л)
1			
2			
3			
4			
5			

Висновки:

Клініко-діагностичне значення:

Органічні порушення при гострих і хронічних ураженнях супроводжуються руйнуванням клітин і призводять до виходу трансаміназ із місця ураження в кров. Так, при інфаркті міокарду рівень АсАТ сироватки крові вже через 3-5 годин після інфаркту різко збільшується (в 20-30 разів). Зростання активності чітко спостерігається через 24-36 годин і лише на 3-7 день активність ферменту знижується до норми.

5.3. РОБОТА НА БІОХІМІЧНИХ АНАЛІЗАТОРАХ

Крім виконання описаних робіт, проводиться визначення індикаторних ферментів крові на біохімічних аналізаторах «Prestige 24i» та «Accent-200».

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть, яка патологія найбільш імовірна при збільшенні в сироватці крові активності аспартатамінотрансферази:

- A. Вірусний гепатит
- B. Ниркова недостатність
- C. Нецукровий діабет
- D. Цукровий діабет
- E. Інфаркт міокарду

2. Укажіть вид дезамінування, який найбільш активно протікає в тканинах організму людини:

- A. Гідролітичне
- B. Внутрішньомолекулярне
- C. Змішане (гідролітичне і внутрішньомолекулярне)
- D. Відновне
- E. Окисне

3. Укажіть фермент, який здійснює дезамінування глутамату:

- A. Глутаматдегідрогеназа

- В. γ -Глутамілтрансфераза
- С. Глутаматдекарбоксилаза
- Д. Глутаміназа
- Е. Цистатіонін- γ -ліаза

4. Укажіть клас ферментів, до якого відноситься глутаматдегідрогеназа:

- А. Трансферази
- В. Ізомерази
- С. Ліази
- Д. Оксидоредуктази
- Е. Лігази

5. Укажіть продукти реакції декарбоксилювання амінокислот:

- А. Ацетон + CO_2
- В. Гліцерин + CO_2
- С. Глюкоза + CO_2
- Д. Кетокислоти + CO_2
- Е. Біогенні аміни + CO_2

6. Укажіть біологічну роль біогенного аміну, що утворюється за рахунок декарбоксилювання глутамату:

- А. Кофермент складних ферментів
- В. Активатор протеосинтезу
- С. Медіатор гальмування ЦНС
- Д. Інгібітор ліполізу
- Е. Інгібітор глюконеогенезу

7. Укажіть біологічну роль гістаміну – продукту декарбоксилювання гістидину:

- А. Активатор секреції шлункового соку
- В. Інгібітор секреції шлункового соку
- С. Активатор секреції бікарбонатів підшлунковою залозою
- Д. Інгібітор секреції бікарбонатів підшлунковою залозою
- Е. Має бактерицидну активність

8. Укажіть біологічну роль серотоніну – продукту декарбоксилювання 5-окситриптофану:

- А. Інгібітор ферментів протеосинтезу
- В. Активатор ферментів глюконеогенезу
- С. Активатор ферментів гліколізу
- Д. Активатор ферментів ліполізу
- Е. Регулятор артеріального тиску і температури тіла

9. При декарбоксилюванні глутамата в ЦНС утворюється медіатор.

Назвіть його:

- А. Аспарагін
- В. Серотонін
- С. Гістамін
- Д. Глутатіон
- Е. ГАМК

10. Укажіть головний фермент тканин організму людини, який бере участь у дезамінуванні амінокислот:

- A. Аспартатдегідрогеназа
- B. Аланіндегідрогеназа
- C. Алкогольдегідрогеназа
- D. Каталаза
- E. Глутаматдегідрогеназа

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 13

1. ТЕМА: Підсумкове заняття зі змістовного модулю 2.

2. МЕТА: Перевірити засвоєння тем занять з питань теоретичної частини і завдання, які пов'язані з темами лабораторних робіт

ЗАНЯТТЯ № 14

1. ТЕМА: Класифікація й властивості гормонів. Механізми дії гормонів (семінар).

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Гормони – біологічно активні речовини, які виділяються в кров ендокринними залозами і гуморальним шляхом (через кров, лімфу, слину, спинномозкову рідину), регулюють усі види обміну речовин і фізіологічні процеси. Гормони є універсальними регуляторами життєдіяльності організму. Вони відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу, впливають на функціональні процеси життя (ріст, метаболізм, розвиток, імунний захист, розмноження, поведінку і адаптацію організму до умов існування).

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Вивчити теоретичний матеріал з класифікації, біохімічних властивостей та механізму дії гормонів білково-пептидної природи та біогенних амінів. Вміти проводити якісне визначення інсуліну.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Клітини залоз внутрішньої секреції синтезують біологічноактивні речовини (**гормони**), специфічні для кожної ендокринної залози, та виділяють їх безпосередньо в кровотік. В цьому полягає їх відмінність від залоз зовнішньої секреції (**екзокринних залоз**), які виділяють свої секрети через протоки в зовнішнє середовище. До числа екзокринних залоз відносять слинні, слізні і потові залози, залози ШКТ, бронхів і т.п.

Гормони (*від др-грец. ὁρμάω – побуджую*) – це біологічноактивні речовини органічної природи, які поступають в кров, досягають з нею різних органів і тканин, де зв'язуються з **рецепторами клітин-мішеней** та впливають на обмін речовин в них (*знижують або стимулюють*) і на їх фізіологічні функції. Гормони є **гуморальними регуляторами** практично всіх життєво важливих функцій організму.

Сучасній науці відомо більше 60 гормонів. Більшість з них нездатні відкладатися в людському організмі і накопичуватися там. Окрім вітаміну Д, який може запасати печінка, і **тиреоглобуліну**. Саме тому для нормального функціонування організму вкрай необхідне безперебійне вироблення гормонів. Їх кількість залежить від фізичного і психічного стану людини, її віку, а також від часу доби.

Класифікація гормонів.

I. За хімічною будовою

1. Білково-пептидні гормони (*вазопресин, окситоцин, гормони гіпоталамусу, інсулін, глюкагон, парат-гормон, кальцитонін, тропні гормони гіпофізу та ін.*).
2. Гормони, похідні амінокислот (*катехоламіни, дофамін, тироксин, серотонін*).
3. Гормони-стероїди (*кортизол, альдостерон, статеві гормони*).

II. За механізмом дії

1. Мембранний (*позаклітинний*) механізм дії (*адреналін, глюкагон, гормони гіпофізу, вазопресин, окситоцин, паратгормон, кальцитонін і ін.*).
2. Цитозольний (*внутрішньоклітинний*) механізм дії (*тироксин, кортикостероїди, гормональні форми вітамінів D₃ та A*).
3. Мембранно-цитозольний (*комбінований*) механізм дії (*інсулін*)

III. За місцем синтезу

1. Гормони центральних ендокринних залоз (*гіпоталамус, гіпофіз*).
2. Гормони периферійних ендокринних залоз (*наднирники, щитоподібна залоза*).
3. Гормони органів змішаних функцій (*інсулін, статеві*)
4. Гормони дифузної ендокринної системи.

IV. За характером біологічної дії

1. Гормони, регулюючі синтез інших гормонів
2. Гормони, регулюючі обмін речовин.
3. Гормони, регулюючі водно-солевий обмін.
4. Гормони, регулюючі обмін кальцію та фосфору
5. Гормони, регулюючі репродуктивну функцію.

V. За об'ємом біологічної дії

1. Істинні (*справжні*) гормони (*гіпоталамус, гіпофіз, епіфіз, щитовидна та паращитовидні залози, острівці Лангерганса підшлункової залози, наднирники; статеві залози*).
2. Гормоноїди (*гормоноподібні речовини*) (*парагормони, тканинні гормони, гістогормони, гормони місцевої дії*).

Рецептори гормонів представляють собою сполуки білкової природи, здатні специфічно взаємодіяти з певними гормонами. Рецептор може бути представлений окремою молекулою, частиною молекули або тільки певною функціональною групою даної молекули. В деяких випадках рецепторами служать мембранні ферменти.

Мембранні рецептори – це складні білки глікопротеїни, в яких структурно виділяють наступні домени:

- а) *позаклітинний (впізнаючий)* – для контакту з первинним месенджером (гормоном) на поверхні плазматичної мембани;
- б) *трансмембранний* – забезпечує просторову орієнтацію рецептора;
- в) *внутрішньоклітинний* – зв'язує рецептор з системою передачі гормонального сигналу на вторинні месенджери, а саме з G-білком-трансдуктором.

Структурно-функціональна характеристика мембранних рецепторів:

1. **Іонотропні** – поєднують функції **рецептора** та **іонного каналу**. Активуються іонами, гормонами, нейромедіаторами, приєднання яких відкриває іонний канал і викликає іонні струми. Передача сигналу – найшвидша (за секунди).
2. **Метаботропні** – типові для білкових гормонів. В комплексі з G-білком-трансдуктором сприяють утворенню вторинних месенджерів. Передача сигналу – за хвилини.
3. **Тирозинкіназні** – одночасно виконують функції **рецептора, трансдуктора і фермента**. Характерний приклад – рецептори до інсуліну.

Види G-білків-трансдукторів:

- активатори аденілатциклази – стимулюють синтез ц-АМФ
- інгібітори аденілатциклази та активатори фосфодіестерази – знижують рівень ц-АМФ (система передачі сигналу соматостатину, простагландинів, ангіотензину II);
- активатори фосфоліпази С (система передачі сигналу вазопресину);
- активатори ГТФ-ази (онкобілки).

Вторинні месенджери – це речовини (сигнальні молекули), які:

- синтезуються в клітині-мішені *de novo* під впливом гормонів
- під впливом гормонів швидко та значно зростає їх концентрація
- активують ланцюг ферментів, котрі здійснюють специфічні, остаточні біохімічні реакції в клітині.

Характеристика найбільш поширених вторинних месенджерів.

1. Циклічний аденозинмонофосфат ц-АМФ – синтезується аденілатциклазою з АТФ, після сигналу від гормону, який передається через G-білок. Активує гормонзалежні ферменти (фосфопротейнінази А), які, в свою чергу, активують виконавчі ферменти.

Через ц-АМФ реалізують свої ефекти адреналін, глюкагон, тропні гормони гіпофізу та ін.

2. Циклічний гуанозинмонофосфат ц-ГМФ – синтезується гуанілатциклазою з ГТФ, після сигналу від гормону, який передається без участі G-білка. Активує гормонзалежні ферменти (фосфопротейнінази G), котрі фосфорилують білки, які транспортують іони хлору, розслабляють гладенькі м'язи судин і серця.

Через ц-ГМФ реалізують свої ефекти Na-уретичний гормон; токсини кишкових бактерій та ін.

3. Кальцій-кальмодулін (Ca^{+2}/KM) – білок кальмодулін, зв'язаний з 4 іонами Ca^{+2} . Після сигналу від гормону активує внутрішньоклітинні ферменти протеїнінази С, які фосфорилують виконавчі кальцій-залежні ферменти: фосфодіестерази, фосфорилази, протеїнінази, фосфоліпазу А2.

Через Ca^{+2}/KM реалізують свої ефекти гормони: кальцитонін, парат-гормон, нейромедіатори.

4. Інозитолтрифосфат активує фосфоліпазу С, яка стимулює вихід Ca^{+2} в цитозоль і активацію відповідних протеїніназ.

5. Диацилгліцерол (ДАГ) проявляє активність через протеїніназу С, регулює активність факторів росту, проліферацію клітин.

Через інозитолтрифосфат і диацилгліцерол реалізують свої ефекти гормони вазопресин, окситоцин, ангіотензин та ін.

Причини порушення функції гормонів в організмі:

1. Недостатність гормону (первинна – зниження синтезу гормону ендокринною залозою в результаті аутоімунних процесів, інфекцій, інфаркту, спадкових захворювань, пухлин та вторинна – порушення механізмів центральної регуляції функції залози).

2. Надлишок гормону (первинний – підвищена продукція гормону залозою чи іншими тканинами (злоякісне переродження), вторинний – порушення механізмів центральної регуляції функції залози, ятрогенний – наслідок лікування гормонами).

3. Несприйнятливність (резистентність) тканин до гормонів (відсутність нормальної реакції тканин навіть на підвищену кількість гормонів як наслідок виникнення дефектів тканинних рецепторів гормонів, появи антитіл до гормонів або спадкової природи).

4. Синтез аномальних гормонів залозами внутрішньої секреції (найчастіше зустрічається при наявності вроджених генетичних відхилень).

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Загальні уявлення про гормони і їхні властивості. Класифікація гормонів за хімічною будовою та механізмом дії.
2. Поняття про органи- та клітини-мішені гормонів. Типи рецепторів: особливості структури й локалізації в клітині.
3. Механізм дії пептидних гормонів та біогенних амінів. Функція компонентів системи передачі гормонального сигналу в клітину: G-білків, аденілатциклази,

фосфодиестерази, фосфоліпази C, вторинних посередників, протеїнкіназ.
Механізми дії адреналіну.

4. Молекулярні механізми дії інсуліну. Рецепторні тирозин-кінази.

5.2 САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть амінокислоту, з якої синтезуються катехоламіни:

- A. Лізин
- B. Тирозин
- C. Треонін
- D. Триптофан
- E. Глутамінова кислота

2. Укажіть гормон, що належить до класу стероїдних гормонів:

- A. Адреналін
- B. Інсулін
- C. Меланотонін
- D. Анренокортикотропін
- E. Кортізол

3. Яка з вказаних сполук не являється вторинним месенджером:

- A. цАМФ
- B. цГМФ
- C. Аденілатциклаза
- D. Інозитолтрифосфат
- E. Діацилгліцерол

4. Які складні білки виконують в організмі функцію рецепторів:

- A. Ліпопротеїни
- B. Фосфопротеїни
- C. Нуклеопротеїни
- D. Глікопротеїни
- E. Хромопротеїни

5. Укажіть іон, що виконує у клітині функцію вторинного месенджеру:

- A. Fe^{3+}
- B. Ca^{2+}
- C. Na^{+}
- D. Mg^{2+}
- E. Mn^{2+}

6. Укажіть індекс G-білку, що активує аденілатциклазу:

- A. I
- B. A
- C. K
- D. S
- E. Q

7. Укажіть вторинний месенджер, який утворюється в результаті дії фосфоліпази C:

- A. цАМФ
- B. цГМФ
- C. Холін
- D. Діацилгліцерол

Е. Na⁺

8. За своєю молекулярною організацією рецептори інсуліну є:

- А. Гетеродимерами
- В. Гетеротетрамерами
- С. Гомодимерами
- Д. Гомотетрамерами
- Е. Гексамерами

9. Одним із ферментів, що фосфорилується рецепторними тирозин-кіназами, є:

- А. Гексокіназа
- В. Фосфоліпаза С
- С. Протеїнкіназа А
- Д. Протеїнкіназа С
- Е. Фосфоліпаза Д

10. Укажіть фермент, який розщеплює вторинний месенджер цАМФ до неактивного АМФ:

- А. Аденілатциклаза
- В. Аденілаткіназа
- С. Гуанілатциклаза
- Д. Фосфодіестераза
- Е. Протеїнкіназа А

7. ЛІТЕРАТУРА (див. на стор. 142)

ЗАНЯТТЯ №15

1. ТЕМА: Лабораторна діагностика та роль білково-пептидних гормонів і біогенних амінів

2. АКТУАЛЬНІСТЬ:

Широкий спектр біологічної активності гормонів обумовлений характерними особливостями їхньої будови. Група азотовмісних гормонів включає в себе гормони білкової природи, а саме білки, пептиди, амінокислоти та їх похідні. Вони синтезуються різними ендокринними залозами та чинять різноманітні біологічні ефекти, регулюючи життєдіяльність організму в цілому.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ:

Сформувати знання про значення та механізм дії білково-пептидних гормонів та біогенних амінів в організмі людини

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Білково-пептидні гормони – це найбільша за кількістю група гормонів, в якій виділяють:

- олігопептиди (*вазопресин, окситоцин, гормони гіпоталамусу*).
- прості білки (*інсулін, глюкагон, парат-гормон, кальцитонін та ін.*).
- складні білки (*тропні гормони гіпофізу, та ін.*).

Так, гормон гіпоталамусу тіроліберін є трипептидом (0,36 кДа), а високомолекулярні білкові гормони можуть мати масу понад 20 кДа, як, наприклад, тиреотропін (28 кДа). Подібність первинної структури деяких пептидних і білкових гормонів свідчить про те, що вони належать до одного сімейства і могли утворитися з одного еволюційного попередника.

Всі пептидні гормони як і біогенні аміни є гідрофільними речовинами. Вони депонуються в великих кількостях в клітинах залоз внутрішньої секреції і надходять в кров по мірі необхідності. Більшість цих речовин переносяться в кровотоці без участі переносників.

Білково-пептидні гормони – це група сигнальних речовин, яка утворюється в організмі за звичайним механізмом білкового синтезу. Відповідна інформація зчитується з ДНК на стадії транскрипції, а синтезована гя-РНК звільняється від інтронів за рахунок сплайсингу. Зріла м-РНК кодує послідовність пептиду, який найчастіше перевищує за молекулярною масою зрілий гормон, оскільки включає інформацію про амінокислотну послідовність не лише власне гормону, а й деяких його «допоміжних» фрагментів. Трансляція м-РНК відбувається на рибосомах за звичайною схемою.

В процесі утворення білково-пептидних гормонів в клітинах ендокринних залоз відбувається утворення поліпептиду, котрий містить в своєму складі амінокислотну послідовність даного гормону, але не має гормональної активності. Така молекула називається препрогормоном і містить в своєму складі (зазвичай на N-кінці) структуру, яка називається сигнальною послідовністю. Ця структура представлена гідрофобними радикалами і потрібна для проходження всієї синтезованої молекули від рибосом через ліпідні шари мембран всередину цистерн ендоплазматичного ретикулуму. При цьому, під час переходу молекули через мембрану в результаті обмеженого протеолізу дана послідовність відщеплюється і всередині ЕПР з'являється прогормон. Потім через систему ЕПР він транспортується в комплекс Гольджі, де закінчується його «дозрівання». Воно відбувається шляхом **обмеженого протеолізу** (під дією специфічних протеїназ від прогормону відщеплюється певний N-кінцевий фрагмент (про-ділянка); утворена молекула вже має специфічну біологічну активність) і **подальшої модифікації**, наприклад утворення дисульфідних містків, глікозилювання і фосфорилування. Зрілий гормон депонується в клітинних везикулах, звідки секретується в міру необхідності за рахунок екзоцитозу.

При синтезі гормонів з числа складних білків-глікопротеїнів (наприклад, фолікулостимулюючого або тиреотропного гормонів гіпофізу) в процесі їх дозрівання в комплексі Гольджі відбувається включення в структуру гормону вуглеводного компонента.

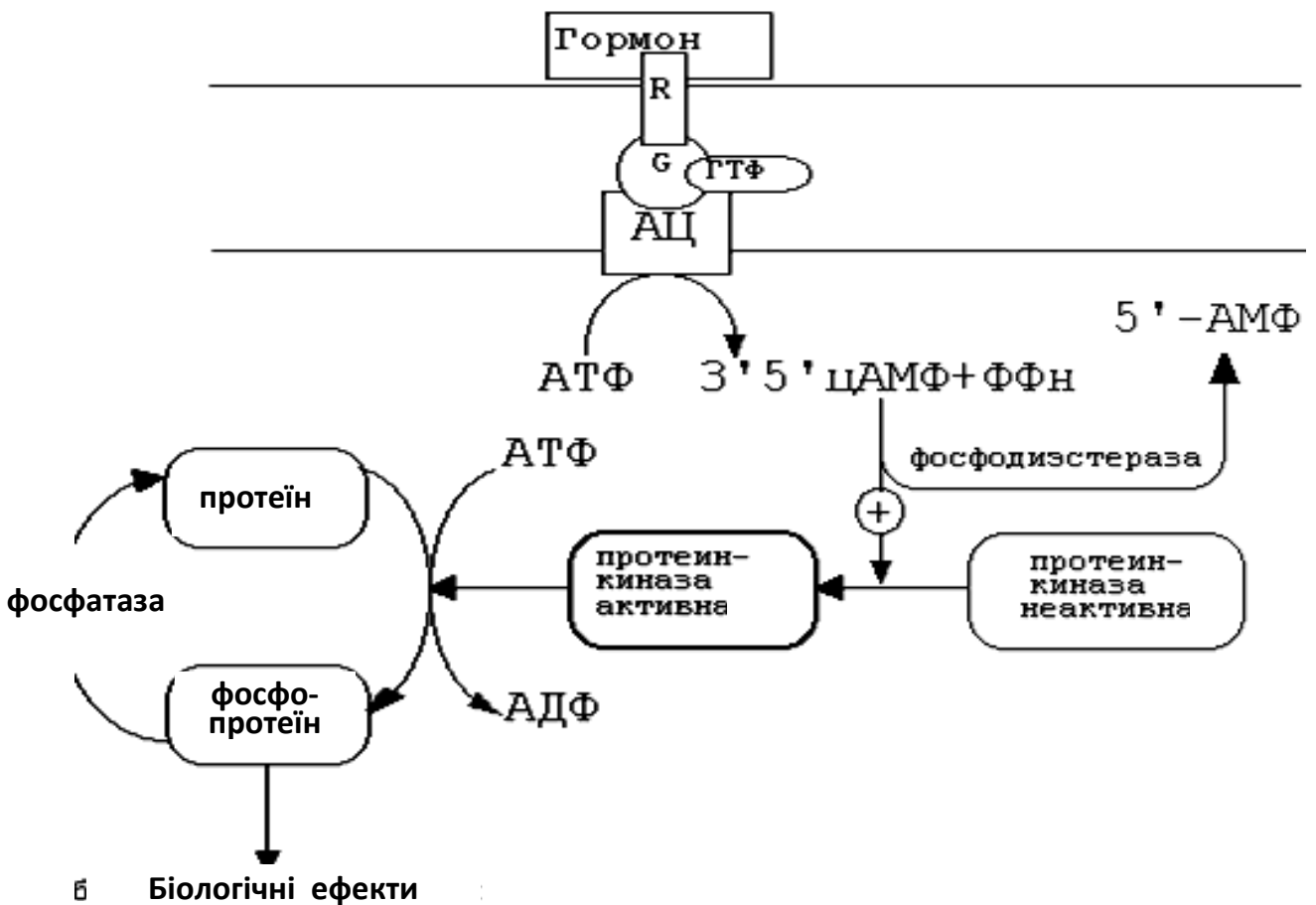
Аналіз гормональних генів показує, що іноді багато абсолютно різних білків кодуються одним і тим же геном. Одним з найбільш вивчених є ген проопіомеланокортину (ПОМК). Разом з нуклеотидною послідовністю, яка відповідає кортикотропіну (АКТГ), цей ген включає послідовності, що кодують ряд невеликих пептидних гормонів, а саме α -, β - і γ -меланотропін (МСГ), β - і γ -ліпотропін (ЛПГ), β -ендорфіну і метенкефаліну (останній може також утворюватися з β -ендорфіну). Прогормоном для всього цього сімейства є так званий поліпротеїн ПОМК. Сигнал про те, який пептид повинен бути отриманий і секретований з нього, надходить із системи регуляції після завершення синтезу даного препропептиду. Найбільш важливим продуктом, який вивільняється з ПОМК, є кортикотропін.

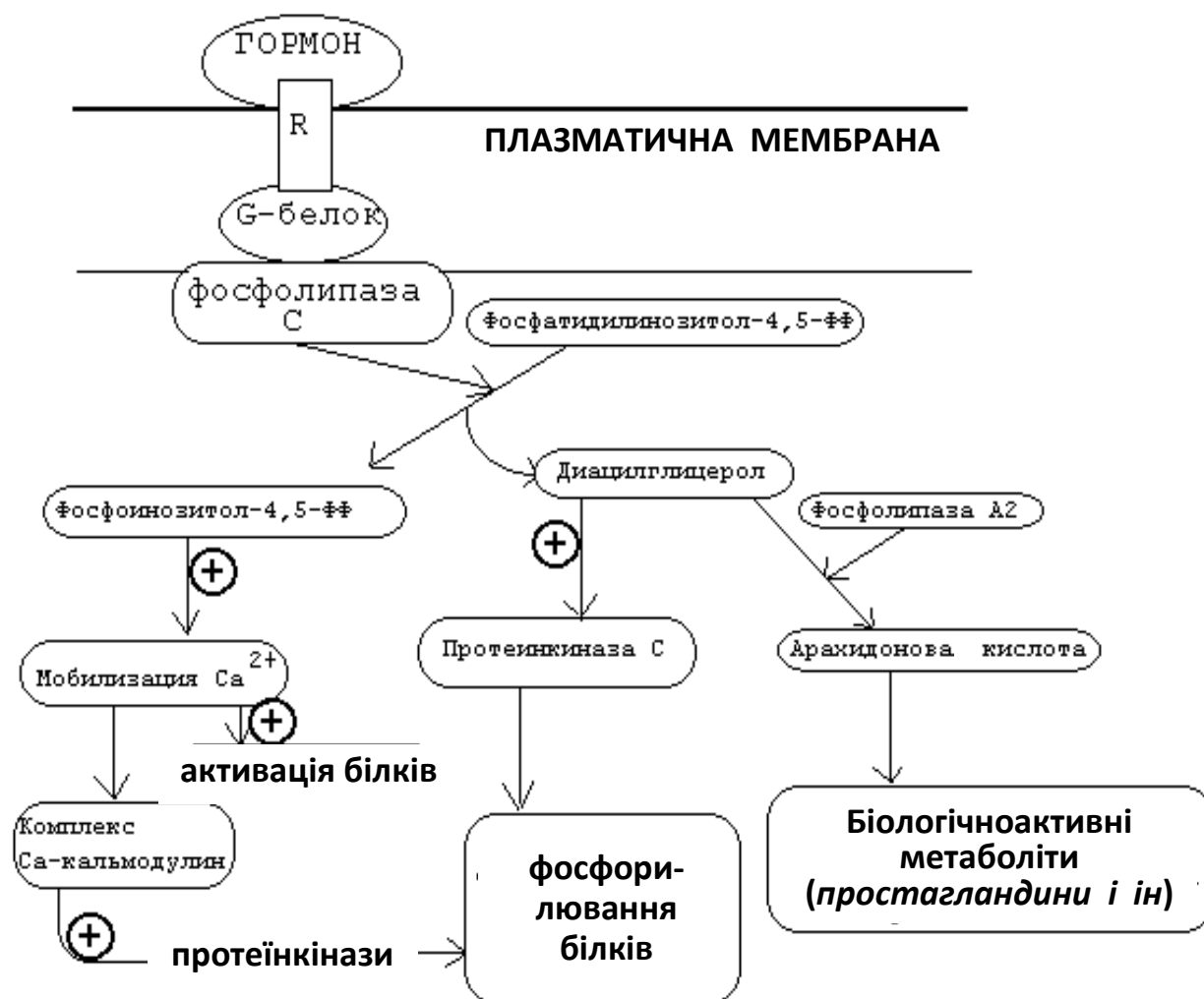
Деградація пептидних гормонів часто починається вже в крові або на стінках кровоносних судин, особливо інтенсивно цей процес йде в нирках. Деякі пептиди, що містять дисульфідні містки, наприклад інсулін, можуть інактивуватися за рахунок відновлення залишків цистину. Інші білково-пептидні гормони гідролізуються екзо- та ендопротеїназами (пептидазами).

Протеоліз веде до утворення безлічі фрагментів, деякі з них можуть проявляти біологічну активність. Багато білково-пептидних гормонів видаляються з системи циркуляції за рахунок зв'язування з мембранним рецептором і подальшого ендоцитозу гормонально-рецепторного комплексу в лізосомах. Її кінцеві продукти – амінокислоти знову використовуються як субстрати в анаболічних і катаболічних процесах.

Гідрофільні та ліпофільні гормони мають різний напівперіод існування: кілька хвилин або годин – для гідрофільних гормонів та кілька годин або днів – для ліпофільних. Біохімічний напівперіод гормонів залежить від активності системи їх деградації. Вплив на дану систему лікарських препаратів або пошкодження тканин може викликати зміну швидкості розпаду, а отже, і концентрації гормонів.

Гідрофільні гормони діють на клітини-мішені за рахунок зв'язування з рецептором на плазматичній мембрані та участі вторинних внутрішньоклітинних посередників. Нижче представлені схеми аденілатциклазного та інозитольного механізмів передачі гормонального сигналу.





5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

5.1 ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Загальна характеристика та механізм дії пептидних гормонів і біогенних амінів – похідних амінокислот.
2. Гіпоталамо-гіпофізарна система та регуляція її функціонування
3. Порушення синтезу гормонів в аденогіпофізі. Чинники, що впливають на лабораторну оцінку вмісту гормонів аденогіпофіза
4. Порушення синтезу гормонів в задній долі гіпофізу

5.2 ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

ПРОТОКОЛ № 15

Дата

1. Визначення інсуліну імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу.

Лінійність методу: 0,0–100,0 мкОд/мл

Нормальні значення: 2,0–25,0 мкОд/мл

Концентрація інсуліну стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реанти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм

- 2) Автоматичні піпетки на 0,025, 0,05 і 1 мл
- 3) Сироватка крові
- 4) Дистильована вода
- 5) Калібрувальні проби
- 6) Концентрат буферу для промивання
- 7) Ензимний кон'югат
- 8) Ензимний комплекс
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кім-натної температури.
2. Внести по 0,025 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,025 мл ензимного кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 30 хвилин при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготвленим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,05 мл ензимного комплексу
8. Інкубувати стрипи при кімнатній температурі 30 хв
9. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготвленим буферним розчином 5 разів
10. Внести у всі лунки по 0,05 мл розчину ТМБ
11. Витримати 20 хв у темному місці для розвитку забарвлення
12. Додати у всі лунки по 0,05 мл розчину сірчаної кислоти (стоп-реагент)
13. Виміряти оптичну щільність в лунках на ридері (довжина хвилі 450 нм).

Розрахунок

Визначення вмісту інсуліну у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком за програмою імуноферментного ридеру

2. Визначення тиреотропного гормону імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані 2 моноклональних антитіла з різною специфічністю до тиреотропного гормону (ТТГ). Один з видів антитіл імобілізований на твердій фазі (внутрішній поверхні лунок), другий вид – зв'язаний з пероксидазою хрину. В лунках, при додаванні досліджуваного зразка та кон'югату анти-ТТГ-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається імобілізація ТТГ, що знаходиться у досліджуваному зразку, та зв'язування його з кон'югатом. При видаленні вмісту з лунок та промиванні відбувається видалення надлишку кон'югату, який не зв'язався з ТТГ під час інкубації. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості ТТГ у досліджуваному зразку.

Лінійність методу: 0,25–15,0 мкМОд/мл

Нормальні значення: 0,23–3,4 мкМОд/мл

Концентрація тиреотропного гормону стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,05, 0,1 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат анти-ТТГ-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,1 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 години при струшуванні та температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготовленим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність в кожній лунці на ридері (довжина хвилі 450 нм).

Розрахунок

Визначення вмісту ТТГ у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру.

3. Визначення пролактину імуноферментним методом

Принцип методу: в наборі використовується «сендвіч»-варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані 2 моноклональних антитіла з різною специфічністю до пролактину. Один з видів антитіл імобілізований на твердій фазі (внутрішній поверхні лунок), другий вид – зв'язаний з пероксидазою хрину. В лунках, при додаванні досліджуваного зразка та кон'югату анти-пролактин-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається імобілізація пролактину, що знаходиться у досліджуваному зразку, та зв'язування його з кон'югатом. При видаленні вмісту з лунок та промиванні відбувається видалення надлишку кон'югату, який не зв'язався з пролактином під час інкубації. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості пролактину досліджуваного зразку.

Лінійність методу: 0–100 000 мМОд/л

Нормальні значення: для чоловіків – 105–540 мМОд/л
для жінок – 67–726 мМОд/л

Концентрація пролактину стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37⁰ С

- 3) Автоматичні піпетки на 0,05, 0,1 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Кон'югат антипролактин-пероксидаза
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 1 год. при струшуванні та температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготовленим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність в лунках на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту пролактину у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру.

Визначення всіх зазначених гормонів проводиться з використанням мікроланшетного інкубатора-струшувача «Stat Fax-2200», термошейкера «Immunochem-2200», імуноферментного аналізатора «Immunochem-2110» та імунохемилюмінесцентного аналізатору IMMULATE SIEMENS 1000.

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Які фізіологічні ефекти викликає тиреотропний гормон?

- A. Знижує продукцію тиреоїдних гормонів
- B. Стимулює синтез тиреоїдних гормонів
- C. Підвищує рівень глюкози
- D. Регулює обмін кальцію
- E. Посилює розпад білків

2. До гормонів гіпофізу глікопротеїдної природи відносяться:

- A. Адrenокортикотропний гормон
- B. Пролактин
- C. Лютеїнізуючий гормон
- D. Тиреотропний гормон
- E. Всі відповіді правильні

3. Які гормони синтезуються нейрогіпофізом?

- A. Вазопресин

- В. Пролактин
 - С. Соматотропний гормон
 - Д. Фолікулостимулюючий гормон
 - Е. Альдостерон
- 4. Ефекторною ендокринною залозою для гормону росту є:**
- А. Щитовидна залоза
 - В. Гіпоталамус
 - С. Підшлункова залоза
 - Д. Тимус
 - Е. Статеві залози
- 5. При надлишку якого гормону розвивається синдром Іценко-Кушинга?**
- А. Соматотропний гормон
 - В. Фолікулостимулюючий гормон
 - С. Окситоцин
 - Д. Норадреналін
 - Е. Адренкортикотропний гормон
- 6. Дефіцит якого гормону викликає появу нецукрового діабету?**
- А. Інсуліну
 - В. Вазопресину
 - С. Гормону росту
 - Д. Тиреотропного гормону
 - Е. Альдостерону
- 7. Ацидофільні пухлини гіпофізу характеризуються підвищеним рівнем в крові:**
- А. Тиреотропного гормону
 - В. Адренкортикотропного гормону
 - С. Гормону росту
 - Д. Меланоцитстимулюючого гормону
 - Е. Всі відповіді правильні
- 8. Середня (проміжна) зона гіпофізу виділяє в кров:**
- А. Ліпотропін
 - В. Окситоцин
 - С. Соматотропін
 - Д. Меланоцитстимулюючий гормон
 - Е. Пролактин
- 9. У хворого спостерігається значне збільшення добового діурезу без глюкозурії. Який гормональний препарат можна рекомендувати для замісної терапії?**
- А. Альдостерон
 - В. Тиреоїдин
 - С. Вазопресин
 - Д. Інсулін
 - Е. Адреналін
- 10. Хворий віком 23 роки скаржиться на головний біль, зміну зовнішньо-го вигляду (збільшення розмірів ніг, рис обличчя), огрубіння голосу, погіршення пам'яті. Захворювання почалося приблизно 3 року тому без видимих причин. Об'єктивно: збільшення надбрівних дуг, носа, язика. Аналіз сечі без особливих змін. Причиною такого стану може бути:**

- A. Гіперпродукція соматотропіну
- B. Дефіцит альдостерону
- C. Гіперпродукція кортикостероїдів
- D. Дефіцит глюкагону
- E. Надлишок тироксину

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 16

1. ТЕМА: Механізм дії та вплив на обмін речовин стероїдних і тиреоїдних гормонів.

2. АКТУАЛЬНІСТЬ: Для стероїдних та тиреоїдних гормонів характерний цитозольно-ядерний механізм дії. Представниками стероїдних гормонів є гормони кори наднирників, статевих залоз. До тиреоїдних гормонів відносять гормони щитовидної залози. Вивчення цих гормонів має важливе значення для розуміння процесів мінерального та основного обміну, статевого розвитку.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичний матеріал з механізму дії, особливостей синтезу, секреції, транспорту в крові та впливу на обмін речовин стероїдних та тиреоїдних гормонів. Вміти проводити їх кількісне визначення в сироватці крові.

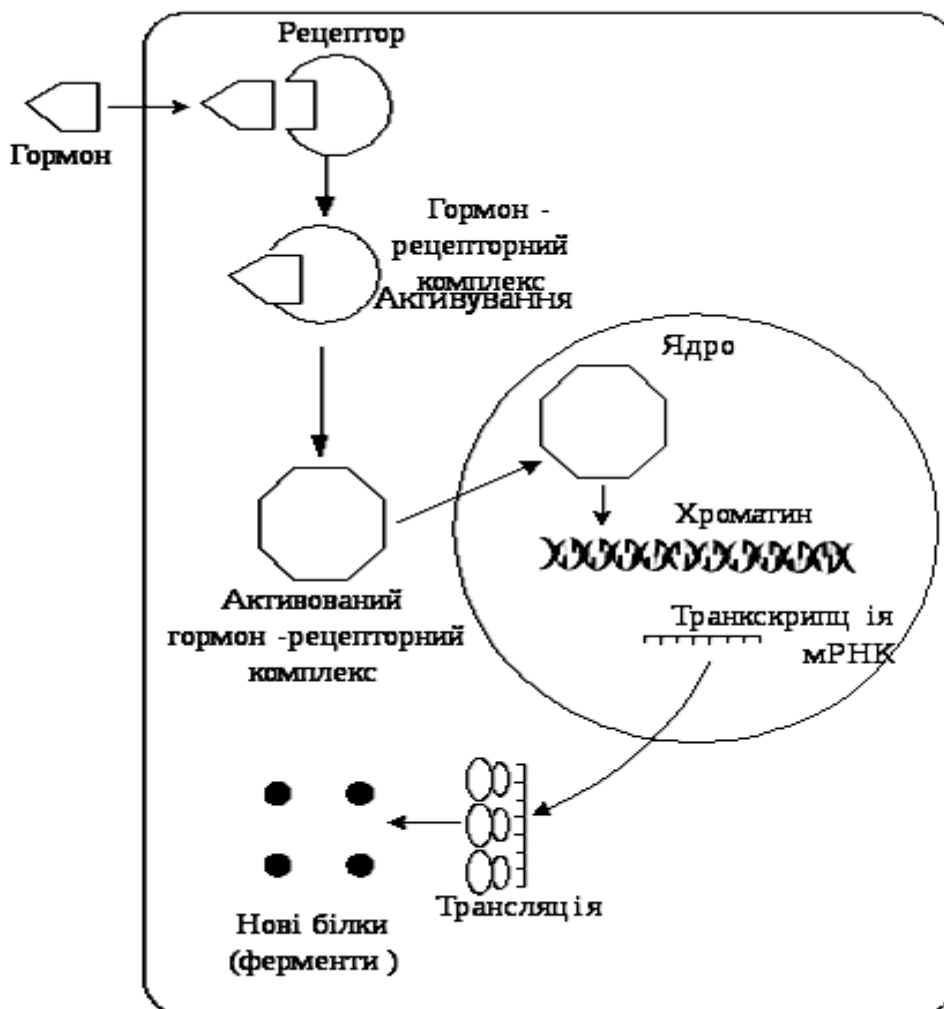
4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Стероїдні гормони, похідні вітамінів групи D, а також йодтироніни (займають проміжне положення між стероїдами та водорозчинними гормонами) здатні проникати через ліпідній бішар плазматичної мембрани клітин, тому свою дію проявляють за допомогою цитозольного механізму. Специфічні рецептори стероїдних та тиреоїдних гормонів містяться в цитоплазмі клітин-мішеней. Вони є білками з Мм 50-190 кДа, мають високу спорідненість до свого гормону за рахунок стереоспецифічності.

Молекулярний механізм дії стероїдних і тиреоїдних гормонів реалізується за рахунок послідовності таких клітинних та біохімічних реакцій: проникнення гормона в клітину → взаємодія гормона з цитозольним рецептором зі зміною конформації останнього та зниження спорідненості до білків-шаперонів, які від'єднуються від комплексу гормон-рецептор → утворення гормон-рецепторного комплексу → транслокація гормон-рецепторного комплексу в ядро → взаємодія комплексу зі специфічною ділянкою ДНК хроматину (енхансером або сайленсером) → зростання (при взаємодії з енхансером) або зниження (при взаємодії з сайленсером) доступності промотора для РНК-полімерази → збільшення (або зменшення) швидкості транскрипції мРНК → збільшення (або зменшення) швидкості трансляції → зміна кількості ферментних білків, які реалізують дію гормона. Зазначені етапи показані на схемі нижче.

Взаємодія білкових рецепторів гормонів з ДНК відбувається в певних місцях промоторних ділянок геному, що знаходяться перед сайтами ініціації транскрипції (приблизно за 250 нуклеотидів) і регулюють експресію відповідних, розташованих на відстані, генів.

Ділянки ДНК, які можуть взаємодіяти з доменами гормонального рецептора, мають будову паліндромів і складаються із специфічних для кожного рецептора нуклеотид-



них послідовностей з 6 пар нуклеотидів.

У взаємодії стероїдних і тиреоїдних рецепторів зі специфічними ділянками ДНК беруть участь певні ділянки рецепторних білків, які мають будову «цинкових пальців» (містять біля 20 амінокислотних залишків, в яких іони цинку зв'язуються переважно з двома залишками цистеїну та двома залишками гістидину) та глобулярних Zn-вмісних доменів, властивих білкам, що виступають як регулятори транскрипції.

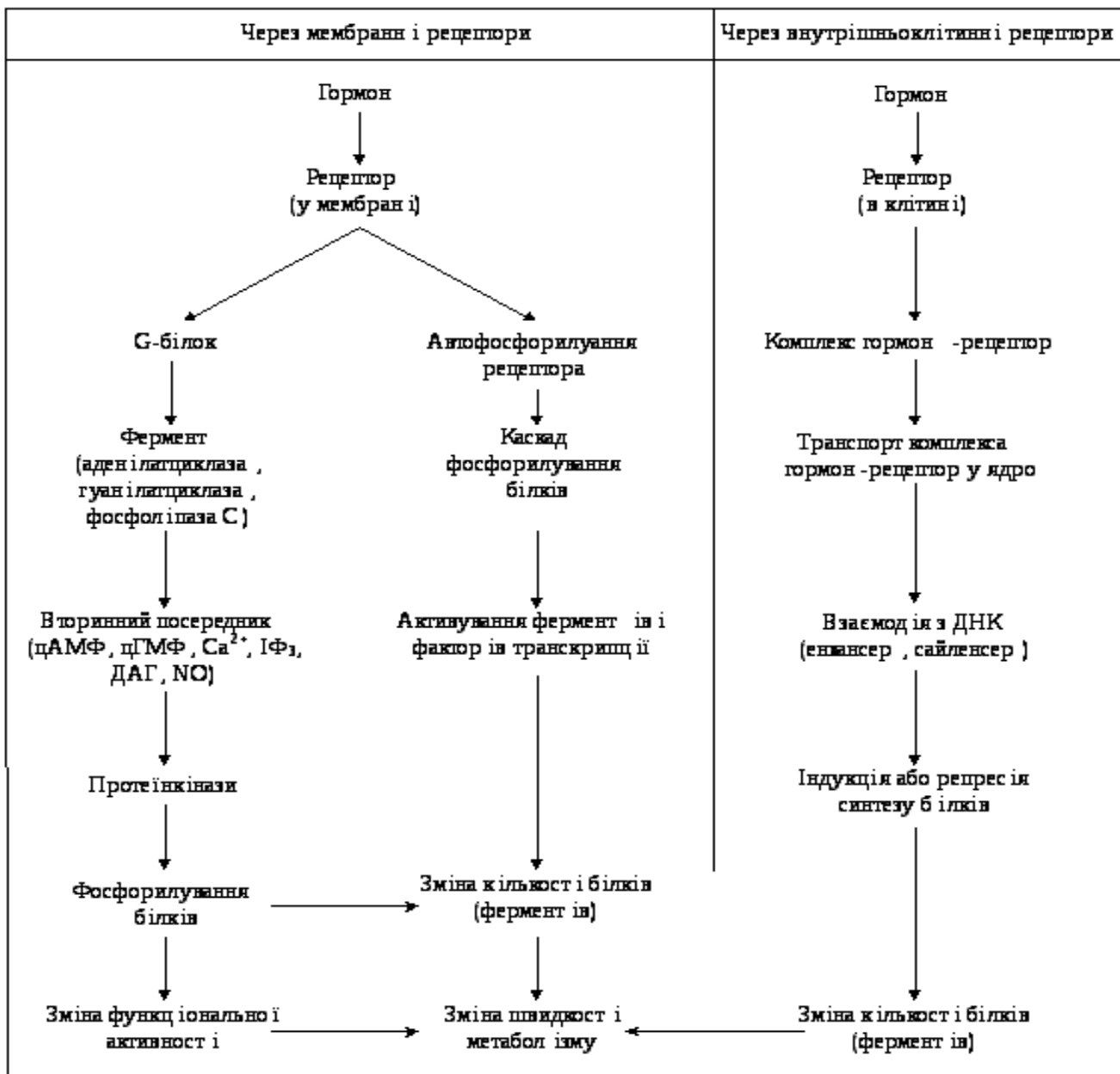
Отже, на відміну від білкових гормонів, що спричиняють активацію ферментів, дія на клітини-мішені стероїдних гормонів призводить до стимуляції біосинтезу нових ферментних молекул за рахунок активації процесів транскрипції їх м-РНК.

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Загальні положення про цитозольний механізм дії ліпофільних гормонів.
2. Гормони кори наднирникових залоз (глюкокортикоїди, мінералокортикоїди): структура, контроль секреції, особливості транспорту в крові.
3. Гормони статевих залоз – андрогени, естрогени, прогестерон: структура, особливості транспорту в крові, регуляція секреції.
4. Тиреоїдні гормони: особливості синтезу й секреції, транспорту в крові.

Порівняльна характеристика дії гідрофільних та ліпофільних гормонів



5.2. ПРАКТИЧНІ РОБОТИ, ЯКІ ВИКОНУЮТЬСЯ НА ЗАНЯТТІ

Протокол №16

Дата

1. Визначення тестостерону імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Тестостерон досліджуваного зразку конкурує з тестостероном, кон'югованим з пероксидазою, за місця зв'язування з антитілами проти тестостерону на дні лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югата пероксидази з антитілами обернено пропорційна концентрації тестостерону в сироватці крові.

Чутливість методу: 0,2 нмоль/л

Нормальні значення: чоловіки: 12,1–38,3 нмоль/л

жінки: 0,1–4,3 нмоль/л

Концентрація тестостерону стабільна протягом 7 діб при температурі +2 - +8⁰ С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реанти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Автоматичні піпетки на 0,025, 0,05 і 1 мл

- 3) Сироватка крові
- 4) Дистильована вода
- 5) Калібрувальні проби
- 6) Концентрат буферу для промивання
- 7) Ензимний кон'югат
- 8) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)
- 9) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,05 мл калібрувальних та досліджуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл ензимного кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 90 хвилин при кімнатній температурі
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготуваним буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Витримати 20 хв у темному місці для розвитку забарвлення
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину сірчаної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту тестостерону у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру

2. Визначення вмісту прогестерону в сироватці імуноферментним методом

Принцип методу: конкурентний імуноферментний аналіз. Прогестерон досліджуваного зразку конкурує з прогестероном, кон'югованим з пероксидазою, за місця зв'язування з антитілами проти прогестерону на дні лунок планшету. Кількість зв'язаного кон'югата пероксидази з антитілами обернено пропорційна концентрації прогестерону в сироватці крові.

Чутливість методу: 0,5 нмоль/л

Нормальні значення: чоловіки: 0,5–5,2 нмоль/л

жінки: фолікулінова фаза – 0,5–6,0 нмоль/л

лютеїнова фаза – 10–89 нмоль/л

Концентрація прогестерону стабільна протягом 2 діб при температурі +2 - +8° С, за умови, що сироватка чи плазма без слідів гемолізу.

Обладнання і реагенти:

- 1) Спектрофотометр вертикального сканування (ридер) з довжиною хвилі 450 нм
- 2) Шейкер-термостат з можливістю підтримування температури +37° С
- 3) Автоматичні піпетки на 0,02; 0,1; 0,15 і 1 мл
- 4) Сироватка крові
- 5) Дистильована вода
- 6) Калібрувальні проби
- 7) Розчин кон'югату
- 8) Концентрат буферу для промивання
- 9) Розчин тетраметилбензидину (ТМБ)

10) Розчин соляної кислоти (стоп-реагент)

Проведення аналізу

1. Всі реагенти перед проведенням аналізу повинні бути доведені до кімнатної температури.
2. Внести по 0,02 мл калібрувальних та ослідуваних зразків у відповідні, відібрані для аналізу лунки
3. Додати у всі лунки по 0,15 мл розчину кон'югату
4. Інкубувати стрип протягом 60 хвилин при струшуванні та температурі +37⁰ С
5. Приготувати буфер для промивання: 5 мл концентрату внести у мірну колбу на 100 мл, дистильованою водою довести до мітки
6. Після закінчення інкубації видалити вміст лунок, промити їх приготовленим буферним розчином 5 разів
7. Внести у всі лунки по 0,1 мл розчину ТМБ
8. Інкубувати при кімнатній температурі 20 хв у темному місці
9. Додати у всі лунки по 0,1 мл розчину соляної кислоти (стоп-реагент)
10. Виміряти оптичну щільність у кожній лунці на ридері при довжині хвилі 450 нм

Розрахунок

Визначення вмісту прогестерону у кожній з дослідних проб проводиться за калібрувальним графіком з використанням програми імуноферментного ридеру.

Визначення всіх зазначених гормонів проводиться з використанням мікроланшетного інкубатора-струшувача «Stat Fax-2200», термошейкера «Immunochem-2200», імуноферментного аналізатора «Immunochem-2110» та імунохемилюмінесцентного аналізатору IMMULATE SIEMENS 1000.

5.4. САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. МАТЕРІАЛИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ

1. Укажіть метаболіт, що є попередником стероїдних гормонів:

- А. Триптофан
- В. Фенілаланін
- С. Холестерин
- Д. Левулінова кислота
- Е. Тирозин

2. Укажіть білок колоїду щитовидної залози, який приймає участь у біосинтезі тиреоїдних гормонів:

- А. Тиреоальбумін
- В. Тиреокальцитонін
- С. Йодтиреоглобулін
- Д. Тиреоліберин
- Е. Тиреостатин

3. Укажіть локалізацію в клітині рецепторів тиреоїдних гормонів:

- А. Ядро
- В. Ендоплазматичний ретикулум
- С. Плазматична мембрана
- Д. Апарат Гольджі
- Е. Лізосоми

4. Укажіть найактивніший з йодтиронінів:

- А. Дійодтиронін

- В. Трийодтиронін
- С. Тетрайодтиронін
- Д. Йодтиреоглобулін
- Е. Монойодтирозін

5. Укажіть кінцевий продукт обміну кортикостероїдів, визначення якого в сечі має діагностичне значення:

- А. 11-Дезоксикортизол
- В. 18-Оксипрегнанелон
- С. 17-Кетостероїди
- Д. 17-Оксипрегненолон
- Е. 21-Дезоксикортизол

6. Укажіть найактивніший мінералокортикоїд організму:

- А. Альдостерон
- В. Дезоксикортикостерон
- С. Гідрокортизон
- Д. Тестостерон
- Е. Естріол

7. Укажіть причину виникнення мікседеми:

- А. Гіпертиреоз
- В. Гіпотиреоз
- С. Гіпокальціємія
- Д. Гіперальдостеронемія
- Е. Гіперплазія наднирників

8. Укажіть назву патології, що викликана аномальним збільшенням концентрації кортизолу в організмі:

- А. Хвороба Вільсона
- В. Хвороба Аддісона
- С. Хвороба Паркінсона
- Д. Хвороба Іценко-Кушинга
- Е. Хвороба Боткіна

9. Укажіть гормон, який може знижувати рівень кальцію та неорганічних фосфатів у плазмі крові:

- А. Тироксин
- В. Інсулін
- С. Кортизол
- Д. Кальцитонін
- Е. Прогестерон

10. Укажіть гормон білкової природи, недостатність якого в організмі викликає тетанічні судоми на тлі різкого зниження концентрації кальцію:

- А. Інсулін
- В. Тироксин
- С. Паратгормон
- Д. Вазопресин
- Е. Адреналін

7. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

1. ТЕМА: Ейкозаноїди. Медіатори та гормони імунної системи (семінар).

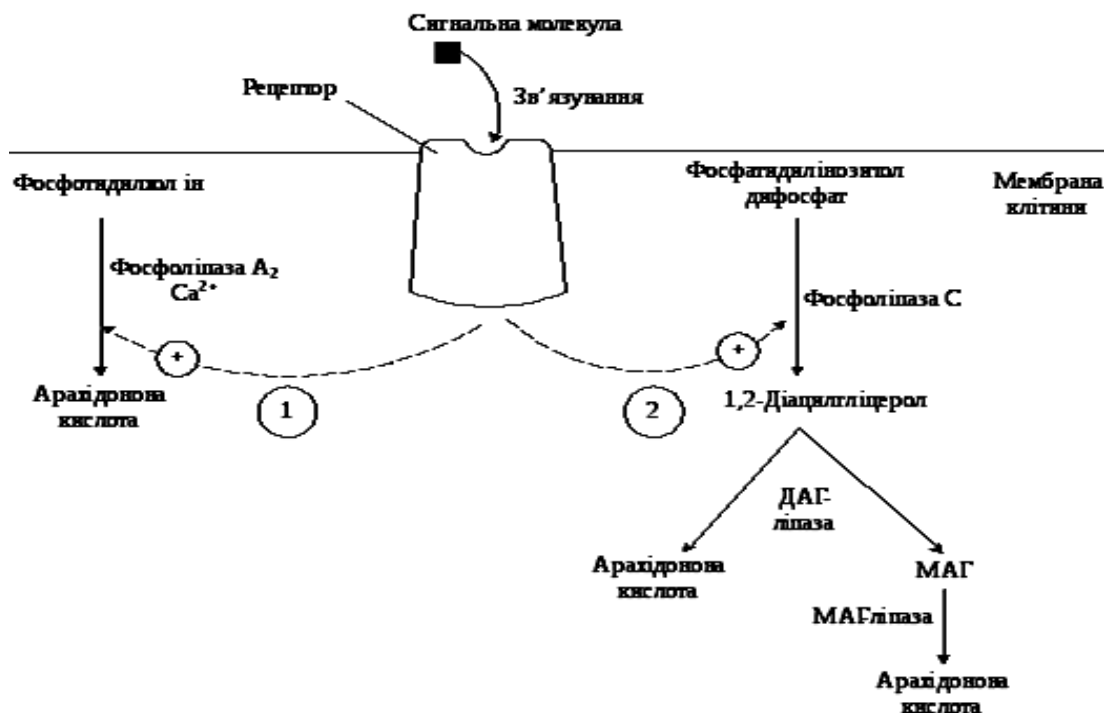
2. АКТУАЛЬНІСТЬ: Ейкозаноїди, як і істинні гормони, належать до сигнальних молекул, що контролюють внутрішньоклітинні процеси, але, на відміну від справжніх гормонів, вони утворюються не в залозах внутрішньої секреції, а безпосередньо в тканинах і в багатьох випадках виступають посередниками в реалізації певних ефектів інших гормонів та медіаторів на клітину.

3. МЕТА ЗАНЯТТЯ: Вивчити теоретичний матеріал з механізму дії, особливостей синтезу та впливу на обмін речовин ейкозаноїдів і тканинних гормонів.

4. ТЕОРЕТИЧНИЙ МАТЕРІАЛ З ТЕМИ

Простаноїди (похідні гіпотетичної простанової кислоти) – це група фізіологічно активних речовин, що утворюються в організмі ферментативним шляхом з деяких незамінних поліненасичених вищих жирних кислот, які містять вуглецевий ланцюг з 20 атомів карбону – дігомо- γ -ліноленової (ейкозатрієнової, 20:3), арахідонової (ейкозатетраєнової, 20:4), тімнодонової (ейкозапентаєнової, 20:5). До простаноїдів відносяться простагландини, тромбосани та простацикліни. В структурі молекул всіх цих речовин є циклічні фрагменти. Разом з лінійними лейкотрієнами та деякими іншими представниками, які теж синтезуються з С-20 ПНЖК, простаноїди входять до класу ейкозаноїдів (*від грецьк. «είκοσι» – двадцять*). Їх період півжиття надзвичайно короткий, тому ефекти вони чинять як «гормони місцевої дії», впливаючи на метаболізм клітин, що їх синтезують, за аутокринним механізмом та на оточуючі клітини – за паракринним механізмом. Біологічні функції ейкозаноїдів реалізуються в надзвичайно низьких концентраціях – близько 10^{-11} М/л. Ейкозаноїди інактивуються протягом декількох секунд в результаті відновлення подвійних зв'язків і окислення гідроксигруп в їх молекулах. Завдяки швидкому руйнуванню дальність та час дії ейкозаноїдів обмежена. Найчастішим попередником ейкозаноїдів є арахідонова (20:4) кислота, тому що її вміст в складі фосфоліпідів плазматичних мембран клітин організму людини значно більший за інших. У вільній формі в клітинах її міститься дуже мало. Звільняється з фосфоліпідного бішару мембран при дії асоційованої з мембраною фосфоліпази А2 (рідше – фосфоліпази С) у відповідь на певні стимули. В меншій кількості для синтезу ейкозаноїдів використовуються дві інші зазначені вище С20-ПНЖК.

Назви ейкозаноїдів завжди складаються з чотирьох символів: дві літери, які позначають до якої групи ейкозаноїдів відноситься дана речовина, далі йде ще одна з літер



англійської мови (в залежності від будови і функції), а потім індекс, що показує кількість подвійних зв'язків в молекулі. В залежності від вихідної жирної кислоти всі ейкозаноїди ділять на три групи:

перша група утворюється з ейкозотрієнової кислоти, яка здатна утворюватися в клітинах при подовженні лінолевої кислоти (18: 3). Для цієї групи відповідно до числа подвійних зв'язків простагландинам і тромбоксаном присвоюється індекс 1, лейкотрієнам – індекс 3, наприклад, PgE1, PgI1, TxA1, LtA3.

друга група (найчастіша) синтезується з арахідонової кислоти (C20:4), за тим же правилом ейкозаноїдам цієї групи присвоюється індекс 2 або 4, наприклад, PgE2, PgI2, TxA2, LtA4.

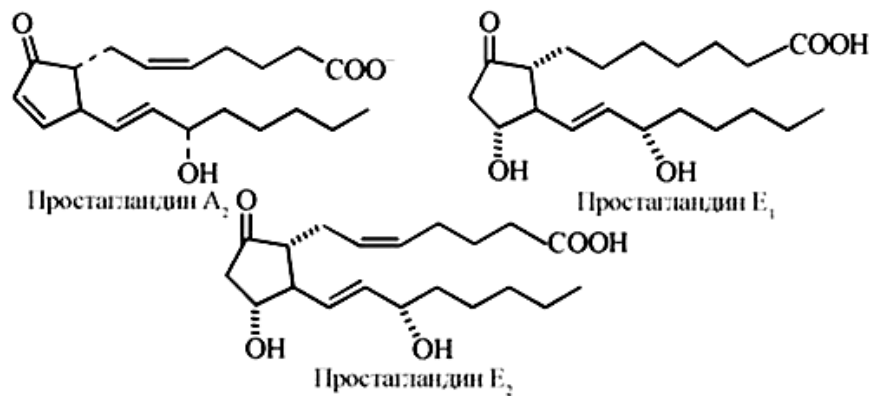
третья група утворюється з тімнодонової кислоти (C20:5), за числом подвійних зв'язків її представникам присвоюються індекси 3 або 5, наприклад, PgE3, PgI3, TxA3, LtA5.

В деяких випадках додатково застосовують літери грецького алфавіту, позначаючи певний ізомер.

Розподіл ейкозаноїдів на групи має клінічне значення, так як їх активність безпосередньо залежить від числа подвійних зв'язків. Особливо яскраво це проявляється на прикладі простагланінів і тромбоксанів. У простагланінів від PgI1 до PgI3 зростає антиагрегаційна і вазодилататорна активність, а у тромбоксанів від Tx1 до Tx3 знижується проагрегаційна і вазоконстрикторна.

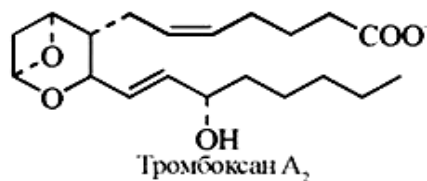
Простагланідини являють собою 20-вуглецеві жирні кислоти, що містять 5-вуглецеве кільце. Довжина бічних ланцюгів в більшості простагланінів складає 7 або 8 вуглецевих атомів: Окремі їх представники розрізняються наявністю та розташуванням кето- або гідроксильної групи в кільці чи бічному ланцюзі, будовою бічних ланцюгів, наявністю в них подвійних зв'язків.

Виявлено шість первинних природних простагланінів, три з них серії E (ether-soluble) і три - серії F (phosphate-soluble). Простагланідини серії E містять в положенні 9 кето-групу, а серії F – гідроксигрупу. Виділено також декілька вторинних простагланінів, які представляють собою продукти ензиматичного перетворення первинних.



Тромбоксани і простацикліни є продуктами ендпероксидації вторинних простагландинів. Тромбоксани утворюються в тромбоцитах і після виходу в кров'яне русло викликають звуження кровоносних судин і агрегацію тромбоцитів. Простацикліни утворюються в стінках кровоносних судин і є сильними інгібіторами агрегації тромбоцитів. Таким чином, тромбоксани і простацикліни виступають як антагоністи. Тому їх співвідношення багато в чому визначає умови тромбутворення на поверхні ендотелію судин.

Тромбоксани містять у своїй структурі 6-членний кисеньвмісний цикл. Їх активна форма – тромбоксани А – в гетероциклічному кільці мають внутрішній атом кисню. Простацикліни (у порівнянні з простагландинами) мають додаткову внутрішню циклічну кис-неву структуру, конденсовану з 5-вугле-цевим кільцем.

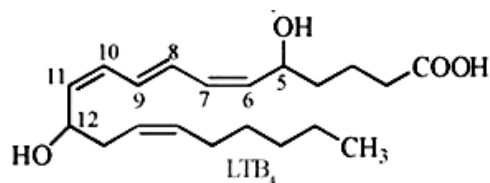


Перший етап синтезу простагландинів каталізує PG H₂-синтаза, яка має два каталітичних центри (циклооксигеназний і пероксидазний). Її зазвичай називають циклооксигеназою. Цей фермент представляє собою димер глікопротеїнів, що складається з ідентичних поліпептидних ланцюгів. Він має гідрофобний домен, занурений в ліпідний шар мембран ЕПР, і каталітичний домен, повернений в його порожнину. В активному центрі циклооксигенази знаходиться тирозин, а в активному центрі пероксидази – гем. В організмі є два типи циклооксигеназ (PGH₂-синтаз). Циклооксигеназа I – конститутивний фермент, що синтезується з постійною швидкістю. Синтез циклооксигенази II індукується відповідними медіаторами – цитокінами. Він збільшується при запаленні. Обидва типи циклооксигеназ каталізують включення 4 атомів кисню в арахідонову кислоту і формування п'ятичленного кільця – утворюється нестабільна гідропероксидпохідна – PG G₂. Гідропероксид біля С15 швидко відновлюється до гідроксильної групи пероксидазою з утворенням PG H₂. До утворення

PG H₂ шлях синтезу різних типів простагландинів однаковий. Подальші перетворення PG H₂ специфічні для кожного типу клітин. Так, в тромбоцитах під впливом тромбоксансинтази з PG H₂ утворюється тромбоксан A₂, який володіє потужною судинозвужувальною дією, а в клітинах ендотелію – простагландин I₂, який розширює судини.

Підвищення температури при ряді захворювань пов'язане з посиленням синтезу простагландинів і порушенням центру терморегуляції. Деякі лікарські препарати пригнічують синтез простагландинів, які активно утворюються у вогнищі запалення і є ефективними лігандами больових рецепторів. Так, кортикостероїди інгібують фермент фосфоліпазу A₂ і тому є більш ефективними протизапальними засобами, ніж ацетилсаліцилова кислота або індометацин - інгібітори циклооксигенази, що безпосередньо каталізує синтез простагландинів з арахідонової кислоти.

Лейкотрієни також синтезуються з ейкозанових кислот, однак, на відміну від розглянутих вище ейкозаноїдів, в їх структурі відсутні цикли і вони мають 3 спряжені подвійні зв'язки (звідки назва «лейкотрієн»). Утворення лейкотрієнів відбувається переважно у клітинах крові – лейкоцитах різних класів, тромбоцитах, макрофагах, що відображає провідну роль лейкотрієнів в реакціях запалення, згортанні крові, алергійних і імунних процесах. Під дією ферменту ліпооксигенази та молекули кисню арахідонова кислота окиснюється до 5-гідропероксиейкозатетраєнової кислоти (5-ГПЕТК) – метаболічного попередника біологічно активних лейкотрієнів. В залежності від типу клітин ліпооксигенази діють на арахідонову кислоту в різних положеннях. Так, наприклад, в поліморфноядерних лейкоцитах міститься в основному 5-ліпооксигеназа, в тромбоцитах – 12-ліпооксигеназа, в еозинофілах – 15-ліпооксигеназа.



Біологічні функції ейкозаноїдів

Ейкозаноїди	Локалізація	Біологічна активність
ПГЕ ₂	більшість тканин, особливо нирки	Розширення судин, розслаблення гладких м'язів, стимуляція пологової діяльності, пригнічення міграції лімфоцитів, проліферації Т-клітин, агрегація тромбоцитів
ПГF _{2α}	більшість тканин	Звуження судин, бронхо – і вазоконстрикція, скорочення гладких м'язів
ПГD ₃	клітини гладких м'язів	Розширення судин, зниження агрегації тромбоцитів і лейкоцитів
ПГI ₂	серце, ендотелій судин	Розширює судини, попереджує агрегацію тромбоцитів, підвищує рівень цАМФ у клітині
ТХA ₂	тромбоцити	Стимулює агрегацію тромбоцитів, звужує судини і бронхи, у клітинах знижує утворення цАМФ
ЛТВ ₄	моноцити, гранулоцити, клітини епітелію	Індукує хемотаксис і агрегацію лейкоцитів, вивільнення лізосомальних ферментів лейкоцитів, посилює проникність судин

ЛТС ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	лейкоцити, макрофаги	Розширюють судини і збільшують їх проникність, викликають спазм бронхів, є компонентами "повільно реагуючої" субстанції анафілаксії
---	-------------------------	---

5. ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ТА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ.

5.1. ТЕОРЕТИЧНІ ПИТАННЯ ДО ЗАНЯТТЯ

1. Ейкозаноїди: шляхи та локалізація синтезу, біохімічні ефекти.
2. Використання лікарських препаратів в регуляції обміну ейкозаноїдів (аспірин та інші нестероїдні протизапальні засоби).
3. Медіатори й гормони імунної системи (цитокіни, інтерферони): хімічна природа, локалізація синтезу, біохімічні ефекти.

5.2 САМОСТІЙНА РОБОТА НА ЗАНЯТТІ

(виконується за індивідуальними завданнями для кожного студента).

6. ЛІТЕРАТУРА (див. стор. 142)

ЗАНЯТТЯ № 18

1. ТЕМА: Підсумкове заняття з модулю 1

2. МЕТА: Перевірити засвоєння тем занять модулю 1 з питань теоретичної частини і завдання, які пов'язані з темами лабораторних робіт

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна:

1. Біологічна і біоорганічна хімія : у 2 кн. нац. підруч. для студ. вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації. Кн. 2. Біологічна хімія / Ю. І. Губський [та ін.] ; за ред.: Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. - 2-ге вид., випр. - Київ : Медицина, 2017. - 544 с.
2. Губський Ю. І. Біологічна хімія : підруч. для студ. вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації / Ю.І. Губський. - 2-е вид. - Вінниця : Нова книга, 2009. - 664 с.
3. Клінічна біохімія : підруч. для студ. вищ. навч. закл. / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків [та ін.]; за ред. О.Я. Склярова. - Київ : Медицина, 2006. - 432 с.
4. Клінічна біохімія : навч. посіб. / за ред. О.П. Тимошенка. - 2-ге вид. - Київ : Професіонал, 2005. - 288 с.

Додаткова:

1. Біологічна хімія : підручник для студентів / за ред. проф. Л. М. Вороніної. - Харків : Основа, 2000. - 608 с.
2. Скляров О. Я. Біологічна хімія : підруч. для студ. стомат. ф-тів вищ. мед. навч. закл. освіти III-IV рівнів акредитації / О. Я. Скляров, Н. В. Фартушок, Т. І. Бондарчук. - Тернопіль : Укрмедкнига, 2015. - 706 с.
3. Назаренко Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. - 2-е изд., стер. - М. : Медицина, 2006. - 544 с.
4. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике : справочное издание / В.С. Камышников. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : МЕДпресс-информ, 2004. - 920 с.
5. Клінічні лабораторні методи дослідження : навч. посіб. / І. А. Зупанець, В. Ф. Москаленко, С. В. Місюрьова [та ін.] ; за ред. І. А. Зупанця, В. Ф. Москаленка. - 2-е вид., переробл. та доп. . - Х. : Вид-во НФАУ: Золоті сторінки, 2001. - 177 с.